T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

UYARILMIŞ WHARTON JELİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ AZOSPERMİ MODELİNDE TESTİS FONKSİYONLARINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Gül Sinemcan KABATAŞ

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI / DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

KOCAELİ

2024

T.C.

KOCAELİ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

UYARILMIŞ WHARTON JELİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ AZOSPERMİ MODELİNDE TESTİS FONKSİYONLARINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Gül Sinemcan KABATAŞ

Kocaeli Üniversitesi

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetmeliğinin

Kök Hücre ve Doku Yenilenmesi Programı için Öngördüğü

BİLİM UZMANLIĞI / DOKTORA TEZİ

Olarak Hazırlanmıştır.

Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimi- Proje No: TDK-2022-2824

Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı (TÜSEB)-Proje No: 27804

Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

Onay Belge No: KOÜ HADYEK 8/1-2020

Danışman: Prof. Dr. Yusufhan YAZIR

KOCAELİ

2024

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ'NE

Tez Adı: Uyarılmış Wharton Jeli Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eksozomlarının Azospermi Modelinde Testis Fonksiyonlarına Etkisinin İncelenmesi

Tez Yazarı: Gül Sinemcan KABATAŞ

Tez Savunma Tarihi: 13.06.2024

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Yusufhan YAZIR

Bu çalışma, sınav kurulumuz tarafından Kök Hücre Anabilim Dalında BİLİM UZMANLIĞI tezi olarak kabul edilmiştir.

SINAV KURULU ÜYELERİ		
UNVANI	**ADI SOYADI**	**İMZA**
BAŞKAN (ÜYE)		
DANIŞMAN (ÜYE)	Prof. Dr. Yusufhan YAZIR	
ÜYE	Doç. Dr. Gökhan DURUKSU	
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI	
ÜYE	Doç. Dr. Özcan BUDAK	
ÜYE	Dr. Öğr. Üyesi Büşra ÖNCEL DUMAN	

Onay

Bu tez Kocaeli Üniversitesi Lisansüstü Eğitim ve Öğretim Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun bulunmuş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla onaylanmıştır.

13/06/2024

Prof. Dr. Sema Aşkın KEÇELİ

KOÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü

ÖZET

UYARILMIŞ WHARTON JELİ KAYNAKLI MEZENKİMAL KÖK HÜCRE EKSOZOMLARININ AZOSPERMİ MODELİNDE TESTİS FONKSİYONLARINA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Amaç: Busulfan, miyelo-ablasyonu indüklemek için lösemi hastalarına rutin olarak reçete edilen alkilleyici bir kemoterapötik ajandır. Ancak kanserden kurtulanlarda azospermi ve infertiliteye neden olur. Bu çalışmada, proinflamatuar sitokinler ile insan Wharton jelinden türetilen kök hücreler (iWJ-MKH) önceden aktifleştirilmiş, ardından busulfanın neden olduğu testis toksisitesine karşı aktif iWJ-MKH'nın testis fonksiyonları üzerindeki potansiyel iyileştirici etkisi aktif olmayan iWJ-MKH ile karşılaştırılarak gösterilmesi amaçlanmıştır.

Yöntem: iWJ-MKH izole edildikten sonra kök hücre farklılaştırılması ve akım sitometrisi ile hücreler karakterize edildi. iWJ-MKH'lerin salgıladığı eksozomların izolasyonu gerçekleştirildi ve elektron mikroskobi, zetasizer analizi ve akım sitometrisi ile karakterize edildi. Azospermiyi indüklemek için, 8-10 haftalık Wistar sıçanlarına sekansiyel çift doz 10 mg/kg busulfan intraperitoneal olarak enjekte edildi. Kontrol grubunda, sıçanlara PBS enjekte edildi. Deney gruplarına önceden aktifleştirilmiş ve aktifleştirilmemiş iWJ-MKH eksozomları 5. hafta intratestiküler olarak enjekte edildi. Johnson skoru, seminifer tübül çapı, epitelyal kalınlık ve bazal membran bütünlük değerlendirilmesi için histopatolojik analiz; sperm morfolojisi için Eosin&Nigrosin boyama; testiste MDA, GSH seviyeleri ve MPO aktivitesi ve serumda IL-1β, INF-γ ve TNF-α seviyelerinin tespiti için ELİSA; Kaspaz-3, PCNA, ZO-1, okludin, Dazl, Vasa, Miwi, protein aktiviteleri için immünohistokimyasal ve Western blot analizleri yapıldı.

Bulgular: Hayvanlar 8 hafta sonra sakrifiye edildi. Kontrol ile kıyaslandığında busulfan indüklü azospermi modelinde şiddetli testiküler hasar oluştu; bu hasar aktif iWJ-MKH eksozomları ile geriye döndürüldü. Artan MDA ve MPO seviyeleri ve azalan GSH aktivitesi, aktif iWJ-MKH eksozomlarının hasarlı testis dokularındaki oksidatif stresi önemli ölçüde azalttığını ortaya çıkardı. Busulfan enjeksiyonu ile artan pro-infalamatuar sitokin değerleri, aktif iWJ-MKH eksozomların intratestiküler uygulaması ile anlamlı şekilde düştü. Aktif kaspaz-3 ve PCNA üzerindeki immünohistokimyasal ve Western blot analizi, aktif iWJ-MKH eksozomlarının busulfanın neden olduğu apoptozu önlediğini gösterdi. Kan-testis

bariyer bütünlüğünü ifade eden ZO-1 ve okludin protein ekspresyonları, busulfan ile önemli oranda hasara uğrarken, aktif eksozom terapisi ile bu hasar geriye döndürüldü. Mayozla ilişkili proteinlerin (Piwil, Ddx4 ve Dazl) ekspresyonları aktif iWJ-MKH eksozomları ile testiste busulfan grubuyla karşılaştırıldığında oldukça yüksekti; bu durum aktif eksozomların spermatogenez hasarını onardığını gösterdi.

Sonuç: Bulgularımız MKH'lerin TNF-a, IL-1β ve IFN-γ ile önceden aktivasyonunun eksozomların parakrin potansiyelini arttırdığını göstermiştiri. Mevcut sonuçlar, aktif MKHeksozomlarının, spermatojenik hücrelerin apoptozunu azaltarak ve hücreler arası adezyon molekülü ekspresyonlarını artırarak busulfan tedavisinden sonra spermatogenez bozulmasını koruduğunu göstermektedir. Toplu olarak bu bulgular, aktif iWJ-MKH eksozomlarının hücre onarımında potansiyel klinik uygulamalarına dair kanıt sağlayabilir ve NOA'nın klinik tedavisi için yeni bir tedavi yaklaşımı olabilir.

Anahtar Kelimeler: İnfertilite, Busulfan, Kök Hücre, Eksozom, Sitokin uyarılması

ABSTRACT

INVESTIGATION OF THE EFFECT OF STIMULATED WHARTON'SJELLY-DERİVED MESENCHYMAL STEM CELL EXOSOMES ON TESTICULAR FUNCTIONS IN THE AZOOSPERMIA MODEL

Purpose: Busulfan is an alkylating chemotherapeutic agent routinely prescribed to leukemia patients to induce myeloablation. However, it causes azoospermia and infertility in cancer survivors. This study aims to demonstrate the potential therapeutic effects of human Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells (hWJ-MSCs) pre-activated with pro-inflammatory cytokines on testicular functions against busulfan-induced testicular toxicity, comparing the effects of active and inactive hWJ-MSCs.

Method: After isolating hWJ-MSCs, cell differentiation and characterization were performed using flow cytometry. Exosomes secreted by hWJ-MSCs were isolated and characterized by electron microscopy, zetasizer analysis, and flow cytometry. To induce azoospermia, sequential double doses of 10 mg/kg busulfan were injected intraperitoneally into 8-10-week-old Wistar rats. In the control group, PBS was injected into the rats. Active and inactive hWJ-MSC exosomes were injected intratesticularly in the experimental groups at the 5th week. Histopathological analysis was conducted to evaluate Johnson's score, seminiferous tubule diameter, epithelial thickness, and basal membrane integrity; Eosin & Nigrosin staining for sperm morphology; ELISA for determining MDA, GSH levels, and MPO activity in the testis and IL-1β, INF-γ, and TNF-α levels in serum; and immunohistochemical and Western blot analyses for protein activities of Caspase-3, PCNA, ZO-1, occludin, Dazl, Vasa, and Miwi.

Results: The animals were sacrificed after 8 weeks. Severe testicular damage was observed in the busulfan-induced azoospermia model compared to the control, and this damage was reversed with active hWJ-MSC exosomes. Elevated MDA and MPO levels and decreased GSH activity revealed that active hWJ-MSC exosomes significantly reduced oxidative stress in damaged testicular tissues. The elevated pro-inflammatory cytokine levels due to busulfan injection were significantly reduced with the intratesticular application of active hWJ-MSC exosomes. Immunohistochemical and Western blot analyses on active caspase-3 and PCNA indicated that active hWJ-MSC exosomes prevented busulfan-induced apoptosis. The expression of ZO-1 and occludin proteins, indicative of blood-testis barrier integrity, was significantly damaged by busulfan, while this damage was reversed with active exosome

therapy. The expression levels of meiosis-associated proteins (Piwil, Ddx4, and Dazl) in the testis were notably higher with active hWJ-MSC exosomes compared to the busulfan group, indicating that active exosomes repaired spermatogenesis damage.

Conclusion: Our findings indicate that the pre-activation of MSCs with TNF-α, IL-1β, and IFN-γ enhances the paracrine potential of exosomes. The current results demonstrate that active MSC exosomes protect against busulfan-induced spermatogenesis disruption by reducing apoptosis in spermatogenic cells and increasing the expression of intercellular adhesion molecules. Collectively, these findings provide evidence for the potential clinical applications of active iWJ-MSC exosomes in cell repair and suggest a novel therapeutic approach for the clinical treatment of NOA.

Key words: Infertility, Busulfan, Stem cell, Exosome, Cytokine stimulation

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimimin her aşamasında hiçbir desteğini esirgemeyen, bugüne gelmemde büyük emeği olan değerli danışman hocam Prof. Dr. Yusufhan YAZIR'a,

Lisansüstü eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini aktararak, her konuda yol gösteren kıymetli hocalarım Doç. Dr. Gökhan DURUKSU, Doç. Dr. Meltem YÜKSEL, Dr. Öğr. Üyesi Zehra Seda HALBUTOĞULLARI, Dr. Öğr. Üyesi Gülçin GACAR' ve Dr. Öğr. Üyesi Serap AYDIN'a,

Tezimin oluşturulmasında ve incelemesinde bilgisi ve engin deneyimi ile bana her daim yol gösteren kıymetli hocam Doç. Dr. Kerem TEKE'ye ve deneylerin oluşturulmasında yardımını esirgemeyen Enes Malik AKDAŞ'a,

Laboratuvarının kapılarını açarak, beni kendi öğrencilerinden ayırmayan, bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, desteklerini ve samimiyetlerini her zaman hissettiğim kıymetli hocalarım Prof. Dr. Murat KASAP'a, Doç. Dr. Gürler AKPINAR'a ve Dr. Mehmet SARIHAN'a,

İlgi ve destekleriyle her zaman yanımda olan Elif İlknur ŞAHİN, Elif Nur AKIN, Rabia Sema SUSOY, Hilal ÇAĞLAYAN, Merzet AYDEMİR ve KÖGEM'deki diğer çalışma arkadaşlarıma,

Aldığım tüm kararlarda beni destekleyen, emeklerini asla ödeyemeyeceğim sevgili annem Müzeyyen MELİK ve her koşulda yanımda olan sevgili eşim Furkan KABATAŞ'a,

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde sağladığı maddi destek için üniversitemizin Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'ne (Proje No: TDK-2021-2506), Türkiye Sağlık Enstitüleri Başkanlığı'na (Proje No: 27804), TÜBİTAK Bilim İnsanı Destek Programları Başkanlığı (BİDEP) 2211-Yurt İçi Lisansüstü Burs Programı'na ve Yükseköğretim Kurulu (YÖK) 100/2000 Doktora Burs Programı'na teşekkür ederim.

ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ

Kocaeli Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne,

Bilim Uzmanlığı tezi olarak hazırlayıp sunduğum "**Uyarılmış Wharton Jeli Kaynaklı Mezenkimal Kök Hücre Eksozomlarının Azospermi Modelinde Testis Fonksiyonlarına Etkisinin İncelenmesi**" başlıklı tezimde başka kaynaklardan yararlanılarak kullanılan yazı, bilgi, şekil, tablo ve diğer malzemeler kaynakları gösterilerek verilmiştir. Tezimde yer alan deneysel çalışmalar/araştırmalar bilimsel ahlak ve değerlere uygun olarak tarafımdan yapılmıştır. Tezimin fikir/hipotezi tümüyle tez danışmanım ve bana aittir.

Yukarıda belirtilen hususlar bir intihal programı (Turnitin) kullanılarak test edilmiş olup, doğruluğunu beyan ederim.

2, 07 2024

Gül Sinemcan KABATAŞ

İmza



İÇİNDEKİLER

ÖZET iv

ABSTRACT vi

TEŞEKKÜR viii

ORİJİNALLİK BİLDİRİMİ ix

SİMGELER ve KISALTMALAR xiii

ŞEKİLLER xv

TABLOLAR xvii

1. GİRİŞ 1

1.1. Erkek Üreme Sistemi 1

1.2. Kök Hücreler 20

1.3. Eksozomlar 24

1.3.1. Eksozomlar için İzolasyon Yöntemleri 30

1.3.2. MKH-eksozomlarının karakterizasyonu 32

1.3.3. Eksozomların Terapötik Etkinliğini Arttırmaya Yönelik Ön Koşullandırma Yaklaşımları 33

1.3.3.1. MKH'in Ön Şartlandırılması: Eksozom Üretiminin Artırılması 34

1.3.3.2. MKH'lerin Sitokinlerle Ön Koşullandırılması 35

1.3.3.3. Hipoksili MKH'in Ön Koşullandırılması 36

1.3.3.4. MKH'in Biyomoleküller veya Kimyasallarla Ön Şartlandırılması 38

1.3.3.5. MKH'den Türetilmiş Eksozomların İşlevini İyileştirmek İçin Gen Aşırı İfadesi 40

1.4. Sitokin kompleksinin MKH-eksozomları üzerindeki etkileri 41

1.5. Erkek İnfertilite Türleri 46

1.5.1. Kemoterapi ajanlarının infertilite üzerindeki etkisi 48

1.5.2. Busulfan'ın spermatojenik hücrelere karşı toksisite mekanizması 49

1.6. Erkek İnfertilitesime Bağlı Hastalıklarda Eksozom Bazlı Tedavi Yöntemleri 54

1.7. MKH'den Türetilen Eksozom Tedavilerinin Gelecekteki Yönleri 55
2. AMAÇ 57
3. YÖNTEM 59
3.1. MKH Karakterizasyonu ve Çoğaltılması 59
3.1.1. Akım Sitometrik Analiz 59
3.1.2. Farklılaştırma Deneyleri 60
3.2. iWJ-MKH'lerinin sitokinler ile uyarımı 61
3.3. MKH eksozomlarının izolasyonu ve karakterizasyonu 61
3.3.1. Eksozomların Akım Sitometri ile İmmünofenotipik Karakterizasyonu 62
3.3.2. Zetasizer Cihazı ile Partikül Boyut Analizi 63
3.4. Mikro-BCA Testi ile Eksozom Miktar Tayini 63
3.5. In vivo Deney protokolü 63
3.6. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler 65
3.6.1. Genel histolojik değerlendirme 66
3.6.2. İmmünohistokimyasal Analiz 66
3.7. Biyokimyasal Analiz 68
3.7.1. Serumda IL-1β, IFN-γ ve TNF-α ölçümü 68
3.7.2. Testis dokusunda MDA, GSH ve MPO düzeylerinin ölçümü 68
3.8. Western Blot Analizi 69
3.9. İstatiksel Analiz 70
4. BULGULAR 71
4. 1. MKH Karakterizasyonu ve Çoğaltılması 71
4.2. iWJ-MKH türevli eksozomların eldesi ve karakterizasyonu 73
4.3. Histolojik ve Biyokimyasal Bulgular 74
4.3.1. Hematoksilen&Eozin ve PAS BoyamaBulguları 74
4.3.2. Biyokimyasal Analiz Bulguları 80
4.3.3. İmmünohistokimyasal Analiz Bulguları 81

4.3.4. Western Blot Analiz Bulguları 85
5. TARTIŞMA 89
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 95
7. KAYNAKLAR 96

SİMGELER ve KISALTMALAR

BCA: Bikinkoninik asit

BSA: Sığır serum albumin

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DFO: Deferoksamin

DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12

ESCRT: Taşıma için gerekli olan endozomal sıralama kompleksi

FBS: Fetal sığır serumu

FITC: Floresan izotiyosiyonat

GDNF: Glial hücre soyundan türetilen nörotrofik faktör

GSH: Glutatyon

H&E: Hematoksilen&Eozin

HIF: Hipoksi ile indüklenen faktörler

HLA-DR: Human leukocyte Antigen=insan lökosit antijeni

IDO: Indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase

IDO: İndoleamin-pirol 2,3-dioksijenaz

IFN-y, İnterferon gama

IgG: İmmünglobulin G

IL-1β: İnterlökin-1 Beta

iPSC: İndüklenmiş pluripotent kök hücreler

iWJ-MKH: İnsan wharton jeli mezenkimal kök hücreleri

Kİ-MKH: Kemik iliği mezenkimak kök hücreleri

KTB: Kan-Testis bariyeri

LPS: Lipopolisakkaritler

MDA: Malondialdehit

MiRNA: Mikro RNA

MPO: Miyeloperoksidaz

NO: Nitrik oksit;

PAS: Periyodik asit-Schiff

PBS: Fosfat tamponlu salin

PE: Fikoeritrin

PGE2: Prostaglandin E2

RB: Retinoblastoma

RNA: Ribonükleik asid

RPM: Dakikadaki Devir Sayısı

SKH: Spermatogonial kök hücreler

TGF: Transforming growh factor-Dönüştürücü büyüme faktörü

TNF-α: Tumor necrosis factor-alpha-Tümör nekroz faktörü alfa

VEGF: Vasküler endotelyal büyüme faktörü

ZO-1: Zonula okluden-1

ŞEKİLLER

Şekil 1.1. Testisler, epididimis ve vaz deferens. 1
Şekil 1.2. Seminifer tübüllerin genel organizasyonu. 2
Şekil 1.3. Seminifer epitel hücrelerinin tanımlanması. 3
Şekil 1.4. Seminifer tübülün enlemesine kesitinin resim şeklindeki görünümü. 4
Şekil 1.5. Germinal epitelyumun büyütülmüş görüntüsü. 5
Şekil 1.6. Spermatogenik döngünün düzenlenmesi. 7
Şekil 1.7. Spermatogenez ile ilgili hipotetik bir örnek gösterimi. 15
Şekil 1. 8. KTB'nin morfolojisi. 18
Şekil 1.9. KTB'nin yıkımı ve yeniden inşasında testis proteinlerinin düzenleyici mekanizması. 19
Şekil 1.10. Kök hücrelerin sınıflandırılması. 22
Şekil 1.11. Kök hücrelerin parakrin fonksiyonları. 23
Şekil 1.12. Tipik eksozomlar. 25
Şekil 1.13. Eksozom ve kök hücre kaynakları. 26
Şekil 1.14. MKH'den türetilmiş eksozom metodolojisi. 27
Şekil 1.15. Eksozom biyogenezi, salgılanması ve alımı. 29
Şekil 1.16. MKH-eksozomları için karakterizasyon adımlarının özeti. 33
Şekil 1.17. Eksozomların salgılanmasını ve terapötik etkinliğini arttırmak için MKH'e yönelik ön koşullandırma yaklaşımları. 34
Şekil 1.18. TNF-a ve IFN-y'nin immün düzenleyici moleküllerin MKH'ler tarafından ekspresyonu üzerindeki etkisi. 44
Şekil 1.19. Erkek infertilite tipleri. 47
Şekil 1.20. Busulfanın hücre döngüsüne etkisi. 49
Şekil 1.21. Busulfan ve DNA veya protein alkilasyonu mekanizmasının yapısı 50

Şekil 3.1. Deneyin şematik gösterimi. 64

Şekil 4.1. İnsan Wharton jeli mezenkimal kök hücrelerinin (iWJMMKH) izolasyonu, kültürü, adipojenik ve osteojenik farklılaşması. 72
Şekil 4.2. MKH'lere ait akım sitometri analizleri. 72
Şekil 4.3. iWJ-MKH-eksozomlarının izolasyonuve karakterizasyonu. 73

Şekil 44. Farklı içerikte elde edilen eksozomların akım sitomeri analizleri. 74
Şekil 4.5. Kontrol sıçanlarının testislerindeki parafin kesitlerinin fotomikrografları. 76
Şekil 4.6. Busulfan uygulamasından 8 hafta sonra sıçanların testislerindeki parafin kesitlerinin fotomikrografları. 77
Şekil 4.7. Busulfan uygulamasından 5 hafta sonrasıçanların testislerine aktif olmayan iWJ-MKH eksozomları uygulanan parafin kesitlerinin fotomikrografları. 78
Şekil 4.8. Busulfan uygulamasından 5 hafta sonrasıçanların testislerine aktif iWJ-MKH eksozomları uygulanan parafin kesitlerinin fotomikrografları. 78
Şekil 4.9. Tüm gruplara ait sıçan testis ağırlık indeksi (A) ve Johnson skoru (B), seminifer tübül çapı (C) ve germinal epitel kalınlık (D) ölçümlerini içeren histomorfometrik parametreler.. 79
Şekil 4.10. Tüm gruplara ait PAS boyaması fotomikrografları. 80
Şekil 4.11. Deney süresinin sonunda farklı deney gruplarına ait testis dokularında MDA, GSH seviyeleri ve MPO aktiviteleri ve serumlarında IL-1β, TNF-α ve IFN-γ seviyeleri...81
Şekil 4.12. Deney grupları arasında aktif Kaspaz-3 ekspresyonları. 82
Şekil 4.13. Deney grupları arasında PCNA ekspresyonları. 83
Şekil 4.14. Deney grupları arasında PİWİL ekspresyonları. 83
Şekil 4.15. Deney grupları arasında DDX4 ekspresyonları. 84
Şekil 4.16. Deney grupları arasında DAZL ekspresyonları. 84
Şekil 4.17. Deney grupları arasında aktif Kaspaz-3 ve PCNA protein ekspresyonu seviyelerinin gösterilmesi.. 86
Şekil 4.18. Deney grupları arasında ZO-1 ve okludin protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi.. 86
Şekil 4.19. Deney grupları arasında Piwil, Ddx4 ve Dazl protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi.. 87
Şekil 4.20. Zo-1, Okludin, Piwil, Ddx4, Dazl, PCNA, Aktif kaspaz-3 ve β-aktin protein miktarlarının gösterilmesi ve gruplara ait bandlar görülmektedir. 88

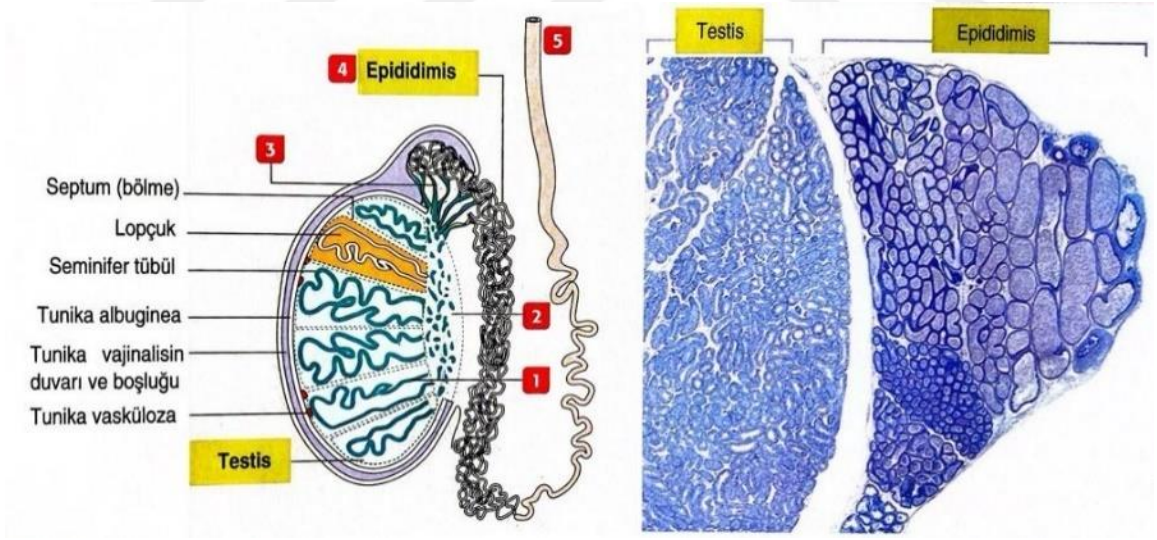
TABLOLAR

Tablo 1.1. Eksozom izolasyon yöntemlerinin özeti. 31
Tablo 3.1. Johnsen skor tablosu 66
Tablo 3.2. Kullanılan primer antikorların detayları. 67

1. GİRİŞ

1.1. Erkek Üreme Sistemi

Testisler, karın boşluğunun dışında skrotum içinde çift olarak yer alan organlardır. Karın boşluğunun dışında yerleşimleri testislerin vücut ısısına göre 2-3 ^{o}C derece daha düşük bir ısıda kalmalarını sağlar ve normal spermatagonezde 34 ^{o}C ila 35 ^{o}C sıcaklık gereklidir. Erişkinlerde testisin arka (posterior) yüzü epididimis ile ilişkilidir; hem testis hem epididimis vaz deferens-spermatik arter-venöz ve lenfatik pleksusları içeren spermatik kordon ile skrotal kese içerisinde askıdadır. Testis, tunika albugina ile çevrilidir ve bu mediastinumu oluşturur (Şekil 1). Mediastinumdan testisin içerisine doğru uzanan fibröz septumlar dokuyu 250-300 adet lobçuğa böler; her bir lobçuk bir ila dört adet seminifer tübülü içerir ve her bir seminifer tübül yaklaşık 150 mikrometre çapında ve 80 cm uzunluğundadır. Bu seminifer tübüllerin her bir ucu rete testise açılan 'U' şeklinde olan tüplerdir.

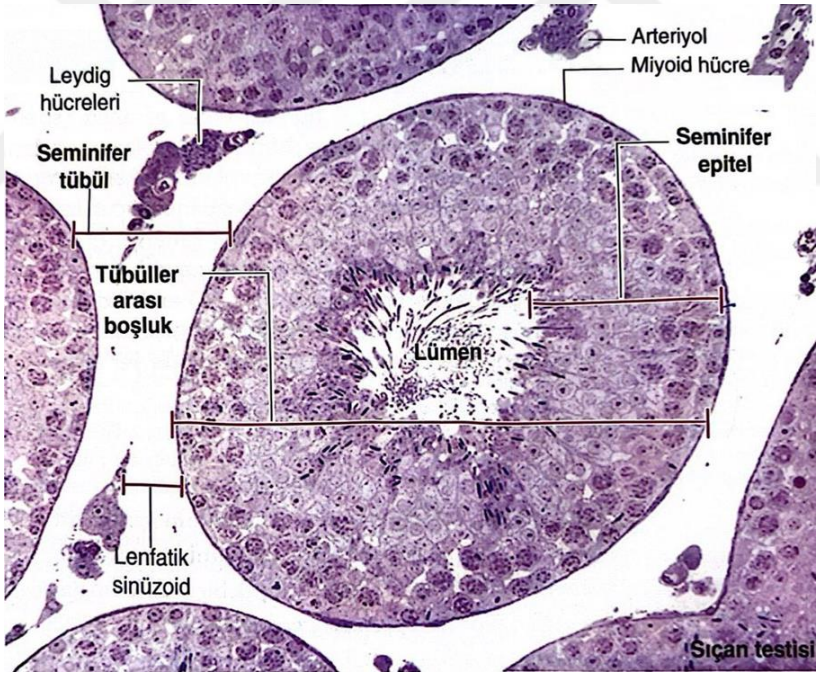


Şekil 1.1. Testisler, epididimis ve vaz deferens (Kierszenbaum ve ark., 2020).

Tubulus rektus, seminifer tübülü rete testisine bağlar; Rete testis, mediastinumun bağ dokusunda yer alan boşluklar ağıdır; Duktuli efferentes, yaklaşık 12-20 spiral sarmal duktuli efferentes rete testisten ortaya çıkar; Epididimis, duktuli efferentes oldukça kıvrıntılı olan tek bir epididimal kanalla birleşir. Vas deferens, kaslı bir tüp, epididimal kanal ile kesintisiz

devam eder. Düz kas duvarlarının peristaltik kasılmaları, spermleri vaz boyunca hareket ettirir.

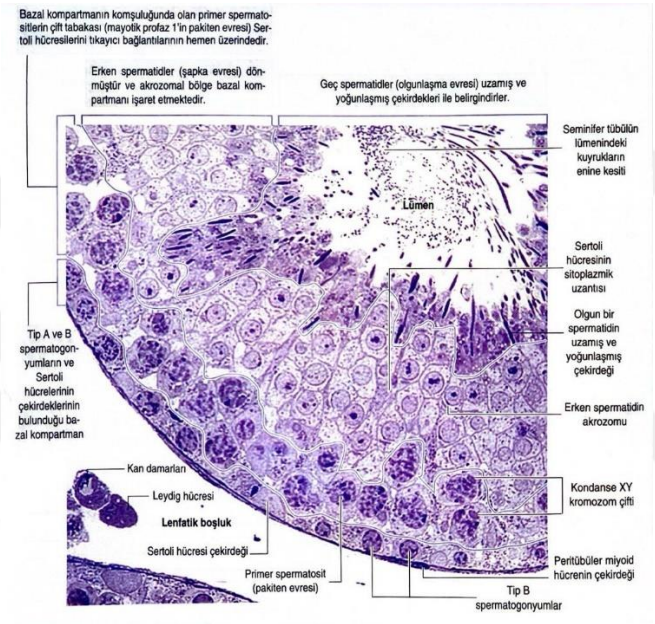
Rete testis; testiküler sperm, salgısal proteinler, sıvı ve iyonlar gibi seminifer epitelin ürünlerini toplayan kanallar ağıdır. Seminifer tübül, seminifer epitelyum ile döşeli merkezi yerleşimli lümenden oluşur ve iki farklı hücre popülasyonu içerir (Şekil 2). Bu hücreler; (1) Somatik Sertoli hücreleri ve (2) spermatojenik hücreler (Spermatogonyumlar-spermatositler ve spermatidler)'dir. Seminifer epitel; fibroblastlar, kollajen lifler ve kasılabilir miyoid hücrelerin bir araya gelmesiyle oluşan bir duvar ve bir bazal membran ile sarılmıştır. Hareketsiz spermleri rete testisine ileten ritmik kasılma eylemlerinden sorumlu olan hücreler miyoid hücrelerdir. Spermler epididimal kanaldan geçtikten sonra ileri motilite (hareketlilik) özelliklerini kazanırlar. Seminifer tübüller arasındaki boşluk arteriyoller, kapillerler ve venülleri içeren kan damarları ve Leyding hücre gruplarını (androjen üreten hücreler) içerir. Lenfatik kanallar ise Leydig hücrelerine yakın yer alır ve seminifer tübülleri çevrelerler (Şekil 2).



Şekil 1.2. Seminifer tübüllerin genel organizasyonu (Kierszenbaum ve ark., 2020).

Seminifer epitel, çok katlı epitel olarak sınıflandırılabilir fakat vücuttaki diğer çok katlı epitellerde olmayan sıra dışı bir karaktere sahiptir. Bu çok katlı epitel, somatik Sertoli hücreler (prizmatik şekilli), spermatogonyumlar (mitoz bölünmeler geçiren hücreler), spermatositler (mayoz bölünmeler geçiren hücreler) ve spermatidler(spermiyogenez olarak

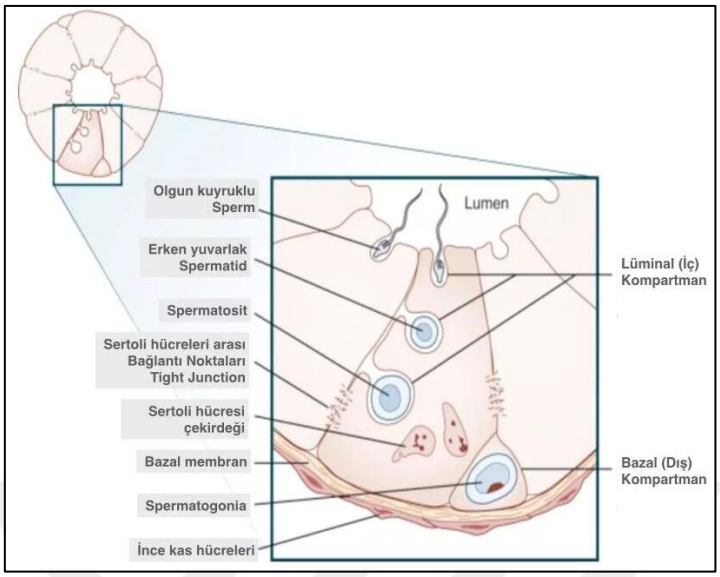
adlandırılan bir süreç geçiren haploid hücre popülasyonu)ile ilişkidedir (Şekil 3). Bu hücrelerin farklı yapısal nukleuslarının olması ayırt edici bir özelliktir. (1) Spermatogonyumların ve Sertoli hücrelerinin nukleuslarıbazal membrana yakın yerleşimli yani seminifer tübül duvarı ile yakın ilişkidedir; (2) primer spermatositlerin ise nukleusları daha geniştir aynı zamanda kromozom kümeleri mayoz bölünme geçirmekte olan kromozomları temsil eder. Bu hücreler Spermatogonyum hücre popülasyonunun üzerinde yer alır; (3) lümene yakın yerleşimli olanlar, yuvarlak ve açık nukleuslarıyla erken spermatidler ve silindirik-şekilli yoğun nukleusları ile karakterize olan geç spermatidlerdir.



Şekil 1.3. Seminifer epitel hücrelerinin tanımlanması (Kierszenbaum ve ark., 2020).

Seminifer epitelin bazal ve adlüminal bölümleri: Sertoli hücreleri bazal laminadan seminifer tübül lümenine doğru uzanan prizmatik hücrelerdir (Şekil 2 ve 4). Seminifer tübüller arası boşluk ve tübül lümeni arasında köprü hücreler ve spermatogenik hücrelerin yaşamlarını sürdürmelerine yardımcı olan hemşire hücreler olarak görev yaparlar.Sertoli hücrelerinin apikal/lateral hücre membranlarında düzensiz sınırlarvardır; çünkü bu düzensiz sınırlar gelişmekte olan spermatogenik hücrelere kriptalar ve nişler sağlar (Şekil 4). Sertoli hücreleri, bazolateral bölgelerinde komşu Sertoli hücreleri ile sıkı bağlantılar oluştururlar. Birçok epitelin sıkı bağlantıları apikal bölgelerinde olmasına rağmen sertoli hücrelerinin sıkı bağlantıları bazolateral bölgesinde bulunur ve bu bir istisnadır.Standart bir epitel yapısında, moleküller ve sıvılar genellikle apikal bölgeden bazal bölgeye doğru sıkı bağlantılar aracılığıyla taşınır. Ancak, seminifer tübüllerde bu durum tersine çevrilmiştir; taşınma bazal

bölgeden apikal bölgeye doğrudur. Aslında, sıvı ve besinlerin kaynağı seminifer tübüller arası boşluktadır, luminal boşlukta değildir.



Şekil 1.4. Seminifer tübülün enlemesine kesitinin resim şeklindeki görünümü (https://blog.ekonsey.com/erkekte-testis-erbezi-nedir/).

Bazolateral sıkı bağlantılar seminifer epiteli ikiye ikiye bölerler: (1) **Bazal kompartman** ve (2) **Adlüminal kompartman.** Spermatogonyal hücre popülasyonu bazal kompartmandaki **nişlerde** yer alır. Böylece, seminifer tübüller arası alanda yer alan kan damarlarından gelen besinler ve sinyal moleküllerinden yararlanırlar. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar **kan-testis bariyerinin** bileşenleridir. Bu bariyer, adluminal kompartmanda gelişmekte olan spermatositleri ve spermatidleri otoimmün reaksiyonlardan korur. Spermatogenik hücre serisi, somatik Sertoli hücreleri (seminifer tübül hücre popülasyonunun kalıcı elemanları) ve spermatogenik hücre soyları (geçici hücreler)'nı içerir. Seminifer tübüllerde spermatogenez olaylarının sırasıyla oluşumu:

1. Puberte döneminde, fetal testisin primordiyal germ hücrelerinden türeyen spermatogonyal kök hücreler (SKH) mitotik bölünme yoluyla yavru iki hücreye ayrılır. Bu hücrelerden biri spermatogenik hücre serisinin başlamasını sağlar, diğeri ise kendini yenileme yeteneğine sahip SKH olarak kalır ve yeni spermatogenik hücre serilerinin oluşumunu destekler. Kök hücreler, başka kök hücreler veya terminal diferansiyasyon sürecine giren hücreler için kaynak görevi görür. Bu durum SKH'ler için de geçerlidir.

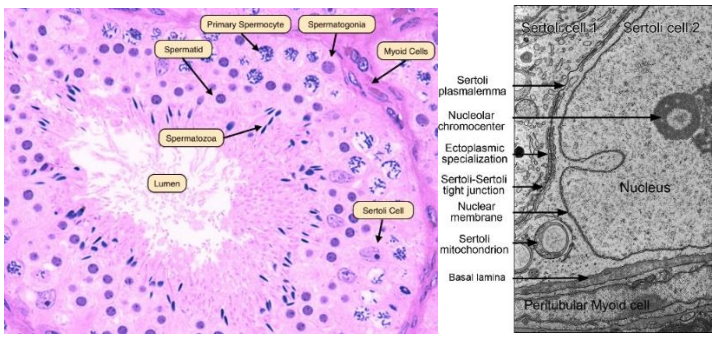
2.Hücre bölünmesi sonrasında, tüm spermatogenik hücreler, sitogenik süreç tamamlanana kadar sitoplazmik köprüler aracılığıyla birbirlerine bağlı kalır.

3.Spermatogonyumlar, spermatositler ve spermatidler belirli bir zaman dilimi içerisinde proliferasyon ve diferansiyasyon süreçlerini geçirir. Her bir spermatogenik kohort, birlikte çoğalarak ve senkronize şekilde farklılaşarak gelişir.

4. SKH'ler, spermatogenik hücre dizilerini düzenli aralıklarla başlatarak sperm üretimini sürekli kılar.

Sertoli hücreleri, puberte dönemine kadar seminifer epitelinin hakim hücre tipleridir. Puberte döneminden sonra bu hücreler seminifer tübüllerin döşemesini oluşturan hücrelerin yaklaşık %10'unu temsil ederler. Puberte sonrası sertoli hücreleri postmitotik hale gelir ve erişkin testislerde mitotik bölünmeler gerçekleşmez. Yaşlanan erkeklerde spermatogenik hücre popülasyonunun azalmasıyla, Sertoli hücreleri epitelin ana bileşenlerine dönüşür. Sertoli hücrelerinin hücre iskeleti, mikrotübüller, aktin mikrofilamanlar ve vimentin ara filamanları içerir ve bu yapılar, diferansiye olan spermatogenik hücrelerin seminifer tübülün periferinden lümenine doğru ilerlemesine yardımcı olur. Spermatogonyumlar, hücrelerarası köprülerle birbirine bağlanır, mitotik amplifikasyon bölünmelerini gerçekleştirir, bazal bölgeden adlüminal bölgeye geçer ve mayotik bölünmelere başlayarak primer spermatositlere dönüşür. Sertoli hücreleri arasındaki sıkı bağlantılar, hücrelerin toplu geçişine olanak tanımak için açılıp kapanabilir.

Sertoli hücrelerinin histolojik preparatlarda nasıl ayırt edileceği sorusuna gelince, en belirgin ayırt edici özellik Sertoli hücre nukleus'udur. Sertoli hücrelerinin sitoplazmik uzantıları düzensizdir ve ışık mikroskobu altında ayırt edilmeleri güçtür. Sertoli hücre nukleusu, hücrenin bazal kısmında, bazal lamina yakınında yer alır ve geniş bir nukleolus ile girintiler ve heterokromatin kitleleri içerir. Hücrenin sitoplazması, düz ve kaba endoplazmik retikulum, mitokondri, lizozomlar, lipid damlacıkları, geniş bir Golgi aygıtı ve gelişmiş bir hücre iskeleti içerir.



Şekil 1.5. Germinal epitelyumun büyütülmüş görüntüsü (https://medcell.org/histology/testis_sperm_development.php).

Sertoli hücrelerinin işlevleri şu şekilde sıralanabilir:

Sertoli hücrelerinin görevleri:(1)Gelişim aşamasındaki spermatogenik hücreleri desteklemek, korumak ve beslemek; (2)Spermiyogenez sürecinin sonunda spermatidler tarafından dökülen ve rezidüel cisimler olarak adlandırılan fazlalık hücre bölümlerini fagositoz yoluyla ortadan kaldırmak; (3)Aktin filamentleri tarafından sağlanan kasılmalarla olgun spermatidlerin seminifer tübül lümenine doğru hareketini kolaylaştıran spermiyasyon sürecini teşvik etmek; (4) Seminifer tübül lümenine protein, laktat ve iyonlar açısından zengin bir sıvı salgılamak; (5)Sertoli hücreleri, spermatogonyal hücrelerin farklılaşmasını düzenlemek için gerekli proteinleri üretir. Folikül-stimüle edici hormon (FSH) uyarımına yanıt olarak Sertoli hücreleri, androjen reseptörleri eksprese eder ve bu reseptörler üzerinden androjenlerin etkisiyle spermatogenez süreci uyarılır. FSH, androjen-bağlayıcı proteinin (ABP) sentezini ve sekresyonunu düzenlemekte önemli bir rol oynar.

ABP **testosteron** ve **dihidrotestosteron** androjenlerine yüksek bağlanma afinitesinde olan bir salgısal proteindir. Androjen-ABP kompleksi, henüz fonksiyonu günümüzde bilinmemektedir, epididimisin proksimal kısımlarına taşınır.ABP salgısal bir protein iken androjen reseptörü DNA bağlanma aktivitesine sahip sitoplazmik ve nükleer bir proteindir. Sertoli hücreleri inhibin ve aktivin alt ünitelerini (alfa ve beta alt üniteleri) salgılarlar: (1) İnhibin (αβ heterodimeri) hipotalamustan ve ön hipofizden salınan gonadotropin salgılatıcı faktör ve FSH üzerine 'negatif feedback' (geri bildirim)bir etki gösterir. (2) Aktivin (αα veya ββ homodimeri) FSH salınımı üzerine 'pozitif feedback' bir etki gösterir.

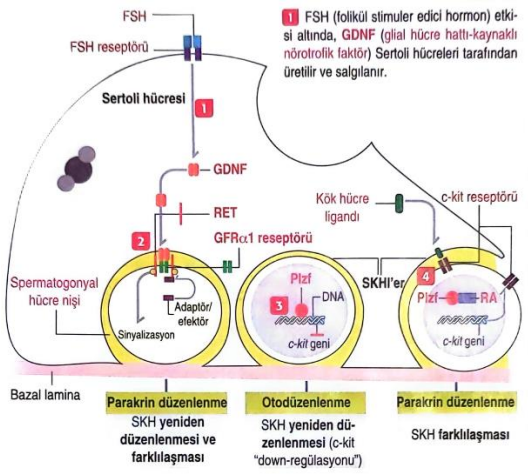
ABP, testosteron ve dihidrotestosteron ile yüksek afiniteli bağlanma özelliğine sahip bir sekretuar proteindir. Androjen-ABP kompleksinin fonksiyonu henüz tam olarak açıklanamamış olup, epididimisin proksimal kısımlarına taşınır. ABP, bir sekretuar protein olmasına rağmen androjen reseptörü, DNA bağlama aktivitesine sahip sitoplazmik ve nükleer bir proteindir. Sertoli hücreleri, inhibin ve aktivin alt birimlerini (alfa ve beta) salgılar: (1) İnhibin, hipotalamus ve ön hipofizden salınan gonadotropin salgılatıcı faktör ve FSH'ye karşı negatif geri bildirim sağlar; (2) aktivin ise FSH salınımını pozitif geri bildirim yoluyla teşvik eder.

Spermatogonyumlar

Spermatogonyumlar, bazal bölgede Sertoli hücreleri ile ilişkili olarak bazal lamina ile doğrudan temas halinde bulunan özgün birçevrede/nişte, yer alan diploid spermatogenik hücrelerdir (Şekil 5). Sertoli hücreleri arasındaki tıkayıcı bağlantıların (tight junction)

altında konumlanır ve bu nedenle kan-testis bariyerinin dışında kalırlar. İki ana morfolojikspermatogonyal hücre tipi gözlenebilir: (1)Tip A spermatogonyumlar oval ökromatik nukleusa ve nucleus zarına tutunmuş nukleolusa sahiptirler. İnsan testislerinde tip A alt grupları (koyu nukleuslu A koyu spermatogonyum ve daha açık renkli nukleuslu A açık spermatogonyumlar) gözlenir. (2)Tip B spermatogonyumların yuvarlak nukleusları, nukleus zarına tutunmuş heterokromatin kitleleri ve merkezi yerleşimli bir nukleolusları vardır.

Folikül stimüle edici hormon (FSH) altında, Sertoli hücreleri, glial hücre hattı-kaynaklı nörotrofik faktör (GDNF) salgılar ve bu faktör, GDNF ailesi reseptörü α1 (GFRα1) ile etkileşerek spermatogonyal kök hücrelerin (SKH) yenilenmesini ve diferansiyasyonunu sağlar (Şekil 6). SKH yenilenmesi ve spermatogonyal diferansiyasyon arasında bir denge esastır; bu denge, üretilen SKH sayısı ile lümene salınan sperm sayısı arasındaki dengenin korunmasını gerektirir. Plzf (promiyelositik lösemi çinko zinciri) adlı bir transkripsiyon faktörü, c-kit tirozin kinaz reseptör geninin ekspresyonunu bloke eder, böylece SKH yenilenmesini sınırlar. SKH'ler yenilenme sürecine hazır olduklarında, retinoik asit Plzf'i baskılar, bu durum c-kit reseptörünün baskılanmasını kaldırır ve böylece c-kit, kök hücre ligandına bağlanabilir hale gelir. Bu ligand, Sertoli hücre membranına bağlanır.



Şekil 1. 6. Spermatogenik döngünün düzenlenmesi. 1. FSH etkisi altında GDNF, Sertoli hücreleri tarafından üretilir ve salgılanır.2. Sertoli hücre kaynaklı GDNF, SKH'ler üzerindeki GFRα1 reseptörüne bağlanır ve bu etkileşim, yakındaki tirozin kinaz reseptörü olan RET'le kompleks oluşturarak RET'in hücresel domeynlerinde tirozin fosforilasyonunu tetikler. Bu süreç, adaptor ve efektör proteinlerin bağlanmasını sağlar ve böylece Sertoli hücrelerinin başlattığı parakrin düzenleyici etkinlik, spermatogonyal kök hücrelerin yenilenmesi ve diferansiyasyon kaskadlarını aktive eder. 3. Bunun aksine, SKH'lerde otoregülatif bir mekanizma mevcuttur, bu mekanizma bağımsız olarak kök hücre havuzunun dengesini sürdürür. Transkripsiyon faktörü Plzf, spermatogonyal kök hücre (SKH)

havuzunun stabilizasyonu için aktif olarak görev yapar. Plzf, spermatogonyal farklılaşmayı engellemek amacıyla c-kit tirozin kinaz reseptör geninin ekspresyonunu inhibe eder. 4. Retinoik asit (RA), Plzf'nin inhibisyonunu kaldırarak c-kit reseptör geninin ekspresyonunu aktive eder. Bu süreç sonucunda, Sertoli hücreleri tarafından salgılanan kök hücre ligandı, c-kit reseptörüne bağlanır ve SKH farklılaşmasını tetikler (Kierszenbaum ve ark., 2020).

SKH'leri düzenleyen iki mekanizma vardır:(1) GDNF-GFRalfa1-RET kompleksi ve c-kit reseptör-kök hücre ligandı kompleksince yönetilen parakrin düzenleyici mekanizma ile Sertoli hücreleri, SKH'lerin yenilenmesini ve farklılaşmasını kontrol eder. (2) Retinoik asit ve Plzf arasındaki etkileşim, c-kit gen ekspresyonunu düzenleyen bir otoregülatör mekanizmadır. Bu düzenleme, SKH'lerin kendini yenileme kararını verir. SKH'ler erkek fertilitesinde kritik rol oynarlar ve radyasyon ile kanser kemoterapilerine göreceli olarak dirençlidirler. Mitoz geçiren spermatogonyumlar, mayoz geçiren spermatositler ve farklılaşan spermatidler, radyasyon ve kemoterapiye hassastır. Radyoterapi ve kemoterapi tedavilerinin bitiminden sonra, SKH'ler spermatogenik süreci yeniden başlatabilir. Postmitotik Sertoli hücreleri, bu tür tedavilere karşı yüksek direnç gösterir. İnsanlarda spermatogonyumların farklılaşmama durumu, neoplastik dönüşümlere yol açarak erişkinde testiküler germ hücre karsinomuna sebebiyet verebilir.

Spermatositler

Spermatositler, Tip B spermatogonyumlar, son S fazını (DNA sentezi) tamamladıktan sonra mayoz bölünmenin profaz aşamasına girer. Bu durum, spermatogonyumun iki kat DNA içerdiği bir primer spermatosit oluşumunu mümkün kılar. Primer spermatosit, 4C DNA içeriğine sahiptir ve bu, yaklaşık olarak hücre başına 1.5 pg DNA'ya eşdeğerdir. Spermatositler, iki başarılı mayoz bölünme geçirerek, Sertoli hücreleri arasındaki bağlantıların hemen üzerinde yer alan seminifer tübülün adlüminal kompartmanında lokalize olurlar. Bu sayede, mayoz bölünmeler kan-testis bariyeri içinde gerçekleşir.

Bir primer spermatosit, redüksiyon bölünmesine girerek iki sekonder spermatosit oluşturur; bu spermatositler, eşitleme bölünmesi ile ikişer spermatid oluşturur. Mayoz sürecinin ilk aşamasının sonunda, primer spermatositlerin 4C olan DNA miktarı, sekonder spermatositlerde 2C'ye düşer ve ikinci mayoz bölünmesi tamamlandığında, DNA miktarı 1C'ye indirgenir. Bu işlemden sonra ortaya çıkan spermatidler haploid yapıdadır ve spermiyogenez adı verilen kompleks bir diferansiyasyon sürecine girerler. Bu sürecin uzunluğu nedeniyle, primer spermatositler seminifer tübüllerde en sık rastlanan hücre tipidir. İkinci mayoz bölünmesi, nispeten kısa sürer (birkaç dakika).

Mayoz

Mayoz bölünme, tip B spermatogonyumların son mitotik bölünmesinin ardından başlar. Ortaya çıkan yavru hücreler S fazında DNA sentezi gerçekleştirir, G2 fazına geçer ve 4C DNA içeriği ile birinci mayoz bölünmeye girerler. Bu bölünme, yaklaşık on gün süren uzun bir profaz evresiyle karakterizedir. Profazın alt aşamaları şunlardır:1. **Leptoten** (ipliksi kromozomlar); 2. **Zigoten** (eşleşen kromozomlar); 3. **Pakiten** (kalınlaşan kromozomlar); 4. **Diploten** (çift görünen kromozomlar); 5. **Diyakinez** (birbirinden ayılarak uzaklaşan kromozomlar).

Bu alt evreler dört temel olayla tanımlanır:

1. Zigoten ve pakiten evresinde, X ve Y dahil olmak üzere homolog kromozomların eşleşmesini kolaylaştıran sinaptonemal kompleksin oluşumu.

2. Homolog kromozomların sinapsisi, böylece rekombinasyon bölgeleri düzenli bir şekilde hizalanır ve köprüleşir.

3. Krossing over, homolog kromozomların kardeş olmayan kromatidleri arasında genetik bilgi alışverişini içerir. Bu alışveriş, kromozomların doğru ayrılmasını sağlayacak fiziksel bağların oluşumuna yardımcı olur. Mayoz rekombinasyonu, sinaptonemal kompleksin bulunduğu bölgelerde başlar ve DNA çift-sarmalı kırıkların oluşumu ile devam eder.Her kromozom arasındaki bu çapraz bağlantılar, düzenli aralıklarla 300 nm ile 30 μm mesafede gerçekleşir, bu da çapraz bağlantı aralığını tanımlar ve DNA çift-zincirini kesip yeniden birleştiren topoizomeraz II enziminin katalitik aktivitesi ile ilişkilidir. Çapraz değişim aralığı, belirli bir kromozom bölgesinde meydana gelen çapraz değişimin, aynı bölgede başka bir çapraz değişimi engellemesine işaret eder.

4. Çapraz değişim tamamlandıktan sonra, ayrılma (disjunction) süreci ile eşleşmiş homolog kromozomlar birbirlerinden ayrılır.

Bu uzun profaz evresinin ardından, kardeş kromatid çiftleri metafaz, anafaz ve telofaz evrelerinden geçerek sekonder spermatositlere dağılır. İkinci mayoz bölünmesi sırasında da bu evreler tekrarlanır ve spermatidler oluşur.

Mayoz bölünmenin üç ana sonucu şunlardır:

1. Her sperm ve ovosit, her homolog kromozom çiftinin sadece bir temsilcisini içerir.

2. Maternal ve paternal kromozomlar rastgele dağıtılır.

3. Krossing over, genetik çeşitliliği artırarak evrimsel adaptasyonu destekler.

Spermatidler

Spermatidler, seminifer tübülün adlüminal kompartmanında, lümene yakın bir konumda yer alırlar ve iki ana tipi bulunur: (1)Erken ya da yuvarlak spermatidler, Sertoli hücrelerinin sitoplazmasındaki nişlerde bulunur. (2)Geç ya da uzamış spermatidler, Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmasındaki derin girintilerde, kriptalarda yer alır.Spermatidler, spermiyogenez olarak adlandırılan oldukça farklılaşmış bir hücre sürecinden geçer. Spermiyogenez, spermatogenezin final aşamasıdır ve olgun spermatidler, spermiyasyon adı verilen bir süreçle seminifer tübül lümenine bırakılır. Spermiyasyon sırasında, Sertoli hücrelerinin apikal ektoplazmik bölgelerinde bulunan F-aktin içeren halkalar, spermatidin baş bölgesinin ayrılmasına neden olan kuvvetleri üretir. Spermatidler, yapısal olarak kutuplaşmış hücrelerdir ve bu kutuplaşma, nükleusa göre zıt kutuplarda yer alan Golgi-akrozom-akroplaksom kompleksi ve baş-kuyruk ilişkilendiren aparat (HTCA) ile karakterize edilir.

Spermiyogenez dört temel olay ile tanımlanır: (1) Akrozom gelişimi; (2) Manşet gelişimi; (3) Akrozomal evre ve (4) Olgunlaşma evresi.

* Golgi evresinde, hyalüronidaz, proakrozin ve diğer hidrolitik enzimler içeren proakrozomal veziküller, motor proteinleri kullanarak (kinezinler ve miyozin Va gibi) mikrotübüller ve aktin mikrofilamanları boyunca Golgi'den akroplaksoma taşınır. Akroplaksom, çekirdeğe bağlı, aktin-sitokeratin içeren bir tabakadır. Proakrozomal veziküller birleşerek öncelikle akrozomal vezikülü, ardından akrozomal keseyi oluşturacak şekilde akroplaksoma entegre olur.

* Şapka evresi sırasında, Golgi kökenli proakrozomal veziküller birleşmeye devam ederek genişleyen akrozomal keseyi oluşturur. Bu kese, spermatid çekirdeğinin uzaması sırasında kaudal inişi tetikler.

Akrozomal şapka benzeri bir yapı alır ve daralan kısmı, çekirdek zarına desmozom-benzeri, keratin ara filaman proteinleri içeren akroplaksomun marjinal halkası ile bağlanır. Akroplaksom plağı, spermiyogeneze özgü LINC (çekirdek ve hücre iskeletini bağlayıcı) protein kompleksi aracılığıyla akrozomu çekirdek zarına sabitler. LINC kompleksi, yoğun çekirdek laminasını akroplaksomdaki F-aktine bağlar.

* Akrozomal evre ve olgunlaşma evreleri arasında, akrozom-akroplaksom kompleksi uzayan spermatid başının profiline uyum sağlar. Proakrozomal vezikül füzyonunu kodlayan Hrb ve

GOPC (Golgi ilişkili PDZ ve coiled-coil motif içeren protein) genlerindeki mutasyonlar, akrozomun düzgün gelişimini bozar. Akrozomun yokluğu, yuvarlak başlı sperm oluşumu (globozoospermi olarak bilinir) ve erkek infertilitesine yol açar.

2. Manşetin gelişimi. Akrozom gelişimi başladıktan hemen sonra, akrozom-akroplaksom kompleksinin kaudal kısmında geçici ve baskın mikrotübül içeren manşet gelişir. Manşet, akroplaksomun desmozom-benzeri marjinal halkasının yakınında, perinükleer halkadan oluşur ve mikrotübüller bu halkaya girer. Bu yapı, uzayan spermatid nukleusunun kaudal kısmını saran iki sıralı halkayı oluşturur. Akroplaksom ve manşet, nukleusun uzamasına uyum sağlamak için çevresel uzunluklarını azaltır. Nukleusun karşıt tarafı, komşu Sertoli hücrelerinin F-aktin halkaları tarafından çevrilir.

Mekanik perspektiften, Sertoli hücrelerinin oluşturduğu F-aktin çemberlerinin dış kavrama kuvvetleri, akrozom-akroplaksom-manşet (AAM) kompleksinin iç kuvvetleriyle birlikte, giderek uzayan spermatid çekirdeğinin şekillenmesine katkı sağlar. AAM kompleksinin bir araya gelişi ve işlevi anormal olduğunda, çeşitli sperm başı şekil bozukluklarına neden olan infertilite meydana gelebilir. Manşet, çekirdek ile sitoplazma arasındaki protein trafiğine katkıda bulunur ve HTCA ile kuyruk gelişiminde rol oynayan proteinlerin taşınmasını sağlar. Motor proteinler (kinezinler, dineinler ve miyozin Va) ve intraflagellar taşıma sistemi proteinleri (IFT proteinleri), çeşitli kargoların manşet boyunca taşınması için işbirliği yapar. IFT proteini IFT88'deki bir bozulma, manşetin taşıma mekanizmasının arızalanmasına ve spermatid kuyruğunun başarısız oluşumuna neden olur. Spermatid çekirdeğinin uzaması ve yoğun paketlenmesi tamamlandığında, manşet dağılır.

3. Sentriyol çifti, gelecekteki sperm kuyruğunun gelişimini başlatmak üzere Golgi bölgesinden spermatid nukleusunun karşı kutbuna doğru göç eder. Sperm kuyruğunun aksonemi, distal sentriyolden gelişirken, proksimal sentriyol ve perisentyolar matriks, sperm başını kuyruğa bağlayan HTCA'ya kaynaklık eder. HTCA, sperm hareketliliği sırasında, sperm kuyruğunun güçlü dalga benzeri hareketlerinin mekanik stresine dayanıklıdır. Spermin başının kuyruktan ayrılması, erkek infertilitesine yol açabilir ve bu, HTCA'nın düzenlenişi ve pozisyonunun hatalı olması durumunda gerçekleşir.

4. Nukleus kondenzasyonu: Somatik histonlar, arginin ve lizinden zengin protaminler ile yer değiştirir ve bu değişim, sperm DNA'sını korur ve stabilize eder. Somatik histonların protaminlerle yer değiştirmesi sonucunda, nükleozomlar kaybolur ve çekirdek materyali, yoğunlaştırmak için yan yana düz kromatin lifleri olarak sıralanır. Spermiyogenezin

olgunlaşma aşamasından sonra, spermatid çekirdeği tamamen kondanse olduğunda, belirgin bir RNA sentezi artık gerçekleşmez.

Spermiyogenez ve spermiyasyonun tamamlanması

Spermatid olgunlaşma evresinin son aşamasında:

1.Mitokondriler, gelişen aksonemin proksimal parçası boyunca dizilir ve dış yoğun fibriller tarafından çevrelenir.

2.Çekirdek tamamen uzar ve kromatin paketlenmesi tamamlanır.

3.Manşet kaudale göç eder ve dağılır.

4.Olgun spermatidin fazla sitoplazması olan ve hücrenin artık ihtiyaç duymadığı Golgi aygıtı içeren artık cisimciği, spermiyasyondan önce bırakılır ve Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilir. Spermiyasyon sürecinde, olgunlaşan spermatidler Sertoli hücrelerinin apikal sitoplazmasından seminifer epitel lümenine bırakılır. Bu süreçte spermatidler birbirine bağlayan hücrelerarası köprüler, artık cisimciğinin bir parçası olarak kalır ve bitişik spermatidler birbirinden ayrılır.

Spermiasyon:

1. Spermiyasyon, spermatidlerin baş yapılarının yeniden şekillendirilmesi, artık cisimciklerin Sertoli hücreleri tarafından fagosite edilmesi ve olgun spermatidlerin birbirinden ayrılmasını içerir.

2. Spermatidlerin, parmak benzeri çapa yapıları olan tübülobulbar kompleksler, Sertoli hücreleri arasında ayrılma sürecidir.

3. Olgun spermatidler, Sertoli hücrelerinin derin apikal kriptlerinden tübül lümenine bırakılır. Bu süreç, hücre iskeleti bağlı mekanizmalar ve hücre adezyon molekülleri (α6β1 integrinler, afadin-nectin-F-aktin kompleksi ve junctional adezyon molekülleri C, JAM-C dahil) tarafından yönetilen spermatidlerin kriptlerden ayrılmasına aracılık eder. Olgun spermatidler, seminifer tübül lümenine bırakıldıktan sonra hareketsiz spermlere dönüşür ve epididimal kanala taşınarak orada ileri hareketlilik özelliği kazanır ve bu süreç, fertilizasyon kapasitesini sağlar.

Spermin yapısı

Olgun bir sperm iki ana bölümden oluşur: baş ve kuyruk. Bu iki bölümü birbirine bağlayan HTCA'dır ve spermin başı ve kuyruğunu hücre zarı sarar. Baş kısmı, nukleusu kısmen örten akrozomla kaplı düzleşmiş, yoğunlaşmış ve uzatılmış bir nukleustan oluşur. Akrozom, nukleusun ön yarısını kaplar ve çoğunlukla lizozomlarda bulunan hidrolitik enzimler içerir. Akroplaksom, akrozomu nukleus zarına bağlar. Kuyruk, üç kısımdan oluşur: Orta parça, Başlıca parça ve Son parça. HTCA, başı kuyruğa bağlar ve çift sentriyol ile ilişkili proteinleri içerir. Distal sentriyol, aksonemi oluştururken, proksimal sentriyol HTCA'nın nukleus zarına bağlanmasına yardımcı olur.

Kuyruğun orta kısmı, mitokondrilerin oluşturduğu sarmal bir tabaka, aksonem ve dış yoğun fibrillerle sarılır ve HTCA'dan kuyruğun altına uzanır. Orta parçanın alt sınırı, mitokondriyal sarmalın sona erdiği annulus tarafından belirlenir. Annulus bölgesinde septin 4 protein içeren kortikal halka bulunur ve bu protein, mikrofilamanlar, mikrotübüller ve ara filamanlardan farklı olarak, hücre iskeletine ait proteinlerden septin ailesine aittir. Septinler, GTPaz aktivitesi ile kortikal korse benzeri yapılar oluşturur. Septin 4 mutasyonu taşıyan erkek farelerde, spermlerin hareketlilik eksikliği nedeniyle kısırlık (astenozoospermi olarak bilinir) görülür. Sperm kuyruğunda, annulus altında kargo proteinlerinin kinezin-aracılı taşınması eksikliği vardır.

Esas parça, sperm kuyruğunun en uzun bölümüdür ve merkezi bir aksonemi ile çevresel yedi dış yoğun fibrilden oluşur. Bu yapı, orta parçadaki dokuz liften farklıdır ve sillerde bulunmayan dış yoğun fibrilleri içerir. Fibröz kılıf, eşit aralıklı uzunlamasına sütunlar tarafından oluşturulan dairesel bir yapıdan meydana gelir. Dış yoğun fibriller ve fibröz kılıf, spermin ileri doğru hareketi sırasında mikrotübüllerin kaymasını ve kıvrılmasını sağlayacak sağlam bir iskelet görevi görür.

Son parça, dış yoğun fibrillerin ve fibröz kılıfın erken sonlandığı, sadece aksonem içeren kuyruğun oldukça kısa bir segmentidir.

Leydig hücreleri

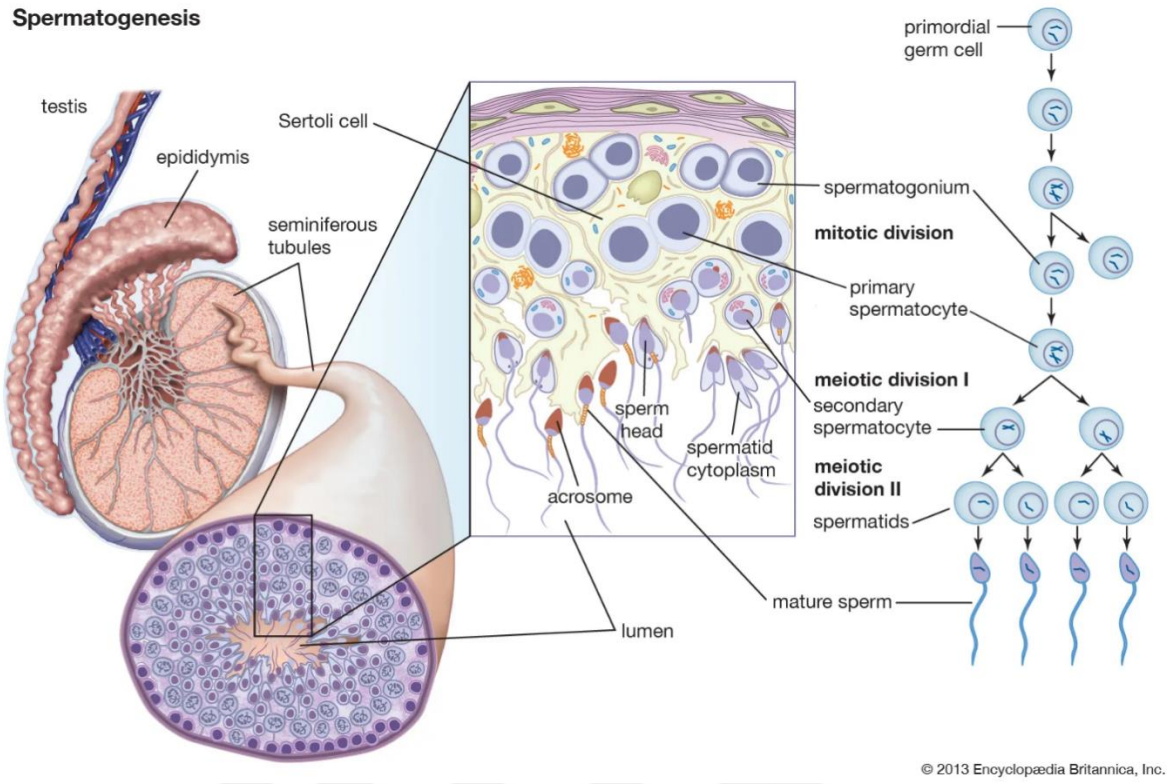
Leydig hücreleri, testislerin tübüler yapıları arasında yer alan, kan damarlarına, lenf kanallarına ve sinüzoidlere yakın bölgelerde gruplanmıştır. Bu hücreler, steroid hormon üretiminde önemli rol oynar ve lipid damlacıkları, karakteristik tübüler kristaller içeren mitokondriler ve iyi gelişmiş bir düz endoplazmik retikulum içerir.

Ergenlik sonrası, siklik adenozin monofosfat (cAMP) aracılığıyla aktive olan luteinleştirici hormon (LH), Leydig hücrelerinde 5α-redüktaz yardımıyla testosteronun dihidrotestosterona dönüşümünü tetikler. Serumda bulunan testosteronun yaklaşık %95'i Leydig hücreleri tarafından üretilirken, kalan kısmı adrenal korteks tarafından sentezlenir. Testosteron, özellikle yağ dokusunda östrojenlere dönüşebilir. Androjen bağlayıcı protein (ABP), folikül uyarıcı hormon (FSH) tarafından Sertoli hücrelerinde üretilir ve bu protein, gelişmekte olan spermatogenik hücreler etrafında yüksek konsantrasyonlarda testosteron bulunmasını sağlar.

Erkek üreme sisteminin hormonal kontrolü

Spermatojenik hücre dizisi

Seminifer tübüllerışık mikroskobu altında incelendiğinde, değişik düzende yerleşmiş spermatojenik hücreleri görmek mümkündür. Spermatojenik hücreler rastgele dağılım yerine, hücresel ilişkiler olarak adlandırılan, iyi tanımlanmış bir düzende organize olduğunu gösterir. Örneğin, seminifer epitelinde belirli bir bölgede, olgunlaşma sürecindeki spermatidler, erken gelişim aşamasındaki spermatidler, spermatositler ve spermatogonyumlar sadece özel bir düzenleme içinde gözlemlenebilir.Bu hücresel ilişkiler, seminifer tübülün belirli bir bölgesinde düzenli olarak birbirini izler. Bu hassas hücresel düzenlemeler, spermiyasyon adı verilen ve olgun spermatidin üretilip tübül lümenine atıldığı süreci tamamlamak için bir dizi döngü içerisinde gerçekleşir.Spermatojenik hücrelerin bütünlüğü, seminifer tübüllerde meydana gelen dikkatle düzenlenmiş bir sürecin sonucudur. Şekil 1. 7'de sunulan hipotetik örnekte, spermatogonyum, spermatosit ve spermatid aşamalarındaki tüm hücrelerin aynı anda gözlemlenmesi mümkündür. Bu aşamalar arasındaki temel fark, seminifer epiteldeki farklı segmentlerde görülen farklılaşma aşamalarıdır. Her bir hücre aşaması, bir önceki ve sonraki nesillerle senkronize bir şekilde gelişir.



Şekil 1. 7. Spermatogenez ile ilgili hipotetik bir örnek gösterimi (https://www.britannica.com/science/spermatogenesis).

Tanımlanmış her hücresel ilişki, Spermatogenez Kök Hücresi tarafından başlatılan ardışık spermatogenez sürecinin bir evresini temsil eder. Spermatogenez süreci, düzenli aralıklarla çoğalan birçok spermatogonyal kök hücreden kaynaklanır ve bu kuşaklar birbiriyle çakışır, bu sayede seminifer tübül içinde farklı kuşaklardan gelen hücresel ilişkileri belirleme imkanı sunar. Bu, spermatojenik döngü ile spermatogenik dalga arasındaki farkın değerlendirilmesine olanak tanır. Seminifer tübül boyuncazaman içinde meydana gelen erken ve geç kuşakların devam eden gelişimi sonucu spermatojenik topluluğu değişime uğrar. Bu döngünün evrelerindeki (hücresel ilişkilerle ortaya konmuştur) değişim tamamen zamana bağlıdır (saatler ve günler).**Bir spermatojenik döngü, seminifer tübülün belli bir noktasındaki hücresel ilişkiler dizisinin (ya da döngünün evrelerinin) değişmesi için geçen zaman olarak tanımlanır.**Şimdi seminifer tübül boyunca yer alan hücre ilişkilerinin hizalanmasını ortaya koymak istediğimizde, görülebilir ki birimimiz zamanından uzaklığa çevrilmiş oldu.Bir seminifer tübülü izole edip, uzunluğu boyunca seri histolojik kesitler alarak, hazır tablolar aracılığıyla hücresel ilişkilerin varlığını doğrulayabiliriz.Birkaç milimetre ya da santimetrelik bir uzunluğu kapsayacack sayıda seri kesit incelediğimizde, seminifer tübül uzunluğu boyunca ardışık hücresel ilişkilerin (ya da döngü evrelerinin)

varlığını görebiliriz.**Uzunlamasına incelenen bir seminifer tübül boyunca dalga şeklinde meydana gelen tam 6 hücresel ilişki ya da evre (bir döngüye eşdeğerdir**) izlenir (Şekil 1. 7).Her birisi 6 ardışık evreden oluşan döngü serileri kendilerini defalarca tekrar eder. Ardışık iki döngü arasındaki mesafeyi ölçerek (her birisi 6 ardışık hücresel ilişkiyi ya da döngü evresini ifade eder) spermatojenik dalgayı tanımlamış oluruz.Herhangi bir tür için, bir döngü içindeki hücresel ilişki ya da evre sayısı sabittir (sıçanda 14 evre, insanda 6 evre, maymunda 12 evre). İnsan testisinde işler bu kadar basit değildir.İnsan testisindeki durum ise daha karmaşıktır. İnsan testisinde, kemirgenlerdeki gibi uzunlamasına ve ardışık diziler yerine, spermatojenik hücre kuşakları sarmal şekilde organize olmuştur. Bu yapısal farklılık, seminifer tübülün bir kesitinde tek bir hücresel ilişki yerine üç ya da dört hücresel ilişkinin görülmesine neden olur. İnsanlarda, bir döngünün süresi 16 gündür ve spermatogonyumdan testiküler sperme dönüşüm dört döngü boyunca, toplamda 64 gün sürer.

1.2. Kan-Testis Bariyeri

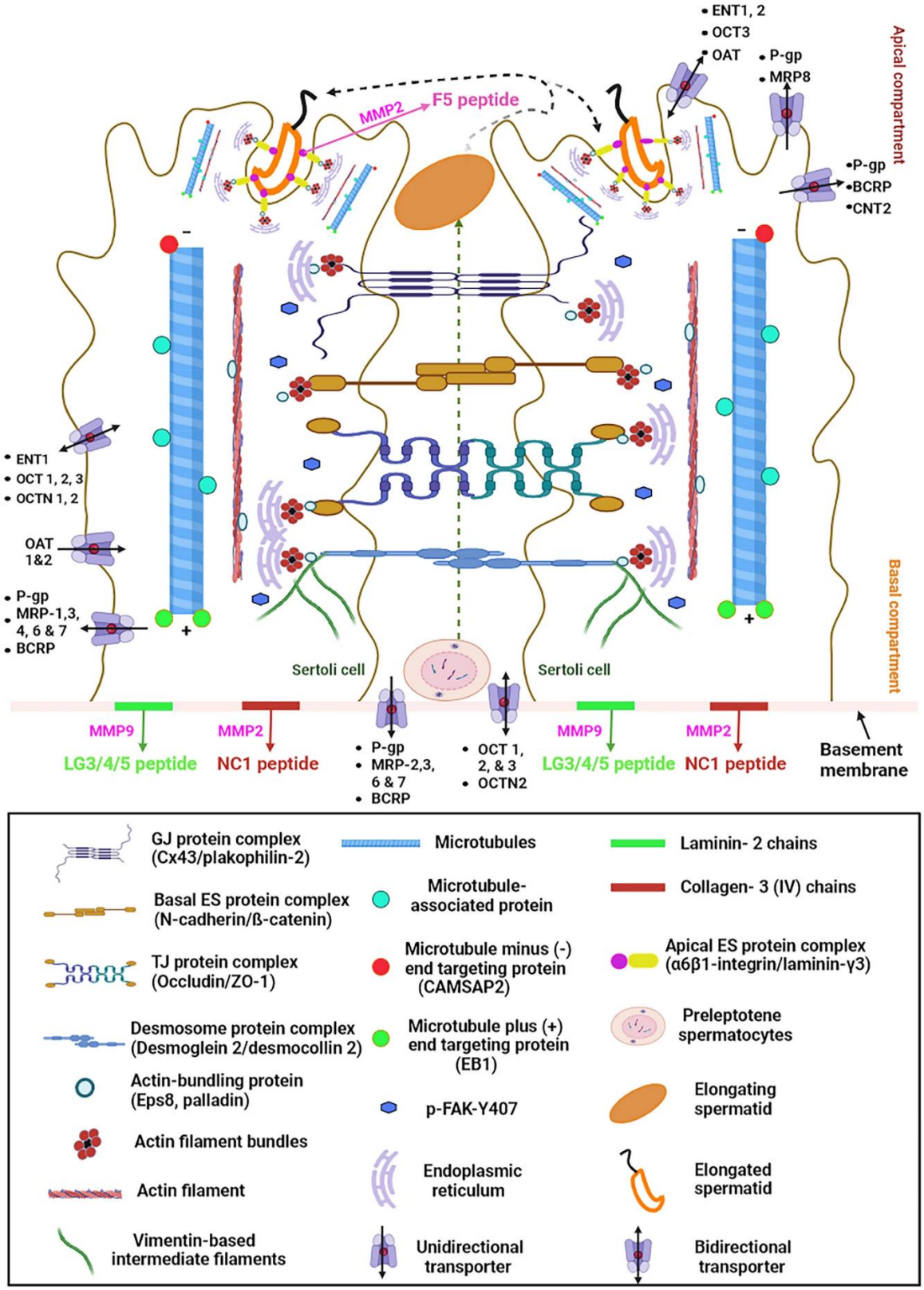
Yirminci yüzyılın başlarından itibaren yapılan çalışmalar kan-doku bariyeri kavramının ortaya çıkmasına neden oldu. Boya bütün hayvanlara enjekte edilmiş ve beyin ve testis gibi önemli istisnalar dışında dokuların çoğunun lekelendiği gözlemlenmiştir (Setchell 2008). Bu gözlem sayesinde kan-testis bariyeri (BTB) (Stanton, 2016) ve kan-beyin bariyeri kavramları geliştirildi (Banks, 2019; Sweeney ve ark., 2019). Bu bariyerler çeşitli rahatsızlıklar için etkili tedaviler bulmayı zorlaştırdığından, kan-doku bariyerlerinin biyolojik işlevi, özellikle bunların düzenlenmesinde daha fazla dikkat çekmektedir.

KTB, insan memeli testislerinde 12-14 yaşları arasında ve sıçanlarda doğum sonrası 17-21. günlerde oluşur (Wanjari ve ark., 2024). KTB, spermatogenez için gerekli uygun bir niş oluşturur ve germ hücrelerinin gelişimi ve olgunlaşması için benzersiz bir mikro ortam yaratır. Testisin önemli bir işlevi, seminifer tübüllerde gerçekleştirilen spermatogenezdir. Spermatogenez yoluyla her gün milyonlarca sperm üretilmektedir. Memelilerde mitoz ve mayoz bölünme spermatogenezde merkezi bir olaydır. Bu merkezi olaylar sırasında preleptoten spermatositler, bazal ektoplazmik özelleşmenin ve sıkı bağlantıların geçici açıklıklarını içeren bazal bölmedeki KTB'yi geçer. Germ hücreleri, yoğun biçimde şekil değiştirerek adluminal bölmeye doğru göç ederler. Dikkat çekici bir şekilde, tüm süreçler spermatogenezde önemli bir adım olan spermiasyonla bağlantılıdır. Spermiasyon, olgunlaşmış spermatidlerin veya spermatozoanın tübül lümenine girdiği ve daha fazla

gelişme için epididime göç ettiği apikal bölmede meydana gelir. Bu süreç apikal ektoplazmik özelleşme ve apikal tubulobulbar kompleksinin geçici olarak bozulmasını içerir. Spermatogenez olaylarının tümü, seminifer epiteldeki bitişik sertoli hücrelerinin karşı ucunda meydana gelir. Buna dayanarak sertoli hücrelerinin bazal ve apikal bileşenler arasında koordine olduğunu söyleyebiliriz.

Hücre iskeleti, mikrotübüller, aktin ve ara filamentler gibi önemli proteinlerden oluşur. Bu proteinler belirgindir ve seminifer tübül epitelini işlevsel olarak destekler. KTB'deki bu hücre iskeleti proteinleri, ağır metaller, plastikleştiriciler ve yüzey aktif maddeler gibi çevresel toksinlere karşı son derece savunmasızdır. KTB bozulduğunda spermatogenezde bir kusura yol açar ve bu da erkeklerde infertiliteye neden olur. Bu nedenle, KTB düzenleyicilerinin daha iyi anlaşılması, son araştırmalarda da gösterildiği gibi, potansiyel olarak toksik maddelerin neden olduğu erkek üreme bozukluklarını ele almak için daha iyi tedavilerin geliştirilmesine yol açabilir. Aynı zamanda, KTB'nin yeniden şekillenmesi olaylarındaki bir kesinti, spermatojenik hücrelerin uygun şekilde göç etmesini ve yönlendirilmesini engeller. Ayrıca epitelden erken germ hücrelerin salınmasına neden olur ve bu da infertiliteye neden olur. Bu nedenle, erkek üreme fizyolojisi için KTB'de spermatogenez sırasında sertoli hücreleri ve germ hücreleri arasındaki düzenleyici faktörlerin derinlemesine anlaşılması gerekmektedir.

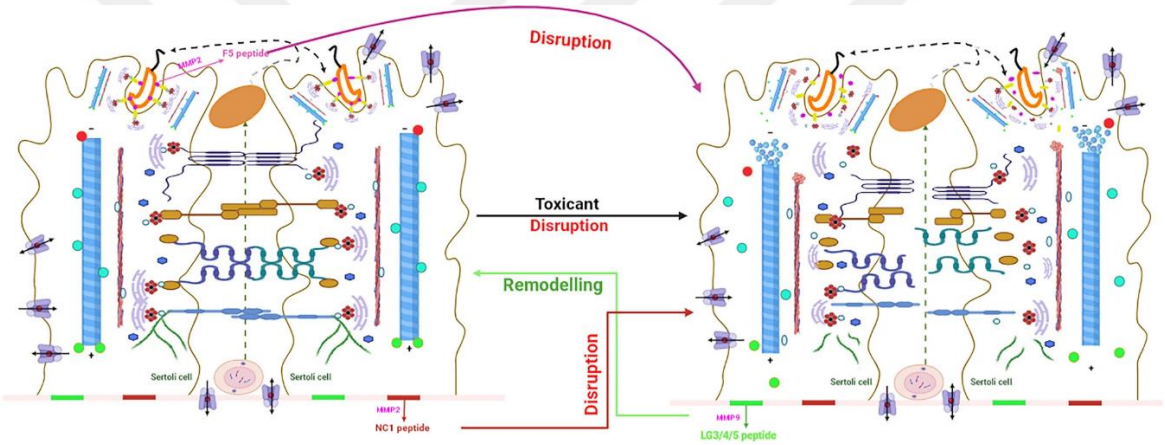
KTB'nin morfolojisi: Bitişik sertoli hücreleri arasında oluşan KTB, testisteki çeşitli protein bağlantılarından oluşur. KTB, güçlü bir hücre yapışma işlevi sağlayan bazal ektoplazmik özelleşme (testise özgü aktin açısından zengin atipik yapışık bağlantı) tarafından desteklenir (Mao ve ark., 2020) (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. KTB'nin morfolojisi (Cao ve ark., 2024).

Bu şekil KTB'nin ve sertoli hücrelerinde ve bazal membranda bulunan taşıyıcıların kompakt yapısını göstermektedir. Ayrıca KTB bütünlüğünün düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan çeşitli proteinlerde gösterilmiştir.

Memeli testislerindeki bazal membran kalınlığı yaklaşık 0,15 µm'dir. Bazal membran, ince, yoğun tabaka benzeri ekstraselüler matrise sahip olan çok hücreli hayvanlardaki tüm epitel ve endotel bazal membranına oldukça benzerdir. Bazal membran ayrıca tunica albuginea'nın hemen altında yer alan testiküler kan kılcal damarları ve lenfatik damarlardan oluşan endotelyumun bir parçasıdır. Ayrıca testisin seminifer tübülünde de oldukça çeşitli işlevlere sahiptir (Liu ve ark., 2021). KTB dinamiklerinin biyolojisini ve düzenlenmesini anlamak için fonksiyonel araştırma yapmak, bileşiminin tam olarak anlaşılmasını gerektirir. Kemirgen testisinde KTB'nin yakınlardaki sertoli hücrelerinde bulunan entegre membran proteinlerinden oluştuğu anlaşılmaktadır.



Şekil 1.9. KTB'nin yıkımı ve yeniden inşasında testis proteinlerinin düzenleyici mekanizması (Cao ve ark., 2024).

KTB, adheren bağlantı (bazal ektoplazmik özelleşme, N-kadherin/β-katenin; nektin-afadin), JAM-A-zonula okluden-1 (ZO-1), klaudin-ZO-1, makula adheren (desmozom, desmoglein-2-desmocollin-2), hücreler arası bağlantı geçitleri (connexin 43/plakophilin-2) ve okludin-ZO-1 dahil olmak üzere sıkı bağlantıların oluşturduğu bazal membranın yakınında yer almaktadır (Şekil 1.8). Böylece KTB, seminifer tübülü apikal ve bazal bölmeler olarak bilinen iki bölmeye ayırır. Her iki bölme de benzerdir, oysa apikal ektoplazmik özelleşme adluminal bölümde bulunur. Adluminal bölgede, uzun spermatidlerin başlarında dikkate değer yapıların bulunmamasından dolayı aktin filaman demetleri bulunur (Şekil 1.8). KTB'nin fizyolojik dinamikleri, ekzojen toksinlere ve kirleticilere maruz kaldığında bozulmaya veya yeniden örgütlenmeye maruz kalan bağlantı

proteini döngüsü ve etkileşimleri tarafından kontrol edilir. Hücre içi ortamdaki anormalliklerin ve sertoli hücre bağlantı kompleksindeki konneksin-43, klaudin-5 ve 11, okludin ve ZO-1 gibi proteinlere verilen zararın spermatogenezi doğrudan etkileyerek infertiliteye neden olan KTB tahribatının birincil nedenleri olduğu keşfedilmiştir (Şekil 1.9).

1.2. Kök Hücreler

Yaşa bağlı ve diğer dejeneratif hastalıklar, tümörler, travma ve konjenital defektler nedeniyle hasar görmüş dokuların yenilenmesi veya yenilenmesi ihtiyacı giderek artıyor. Rejeneratif tedavide ilk tercih, biyopsi ile elde edilen, in vitro olarak genişletilen ve yapay ve/veya doğal malzemelerden yapılmış uygun iskelelere ekilen farklılaşmış hücreler kullanılarak hasarlı dokuların yeniden yapılandırılmasıdır. Farklılaşmış hücreler, belirli bir uygulama için doğru fenotipe sahiptir ve istenen biyolojik işlevleri yerine getirir; hücre dışı matrisi doğru organizasyonla üretirler, spesifik sinyal molekülleri salgılarlar ve komşu hücreler ve dokularla düzgün şekilde etkileşime girerler. Bununla birlikte, doku mühendisliği uygulamalarında farklılaşmış hücrelerin kullanımı genellikle toplanan hücrelerin az miktarda olması ve in vitro olarak genişlerken düşük proliferasyon potansiyelleri nedeniyle sınırlıdır. Bu özellikle rejeneratif tedavilere ihtiyaç duyan yaşlı ve polimorbiditesi olan hastalar için geçerlidir. Her ne kadar karaciğer gibi bazı organlar in vivo olarak yüksek bir rejeneratif kapasiteye sahip olsa da diğer organlardan hücrelerin yetiştirilmesi ve genişletilmesi in vitro olarak karmaşık olabilir.

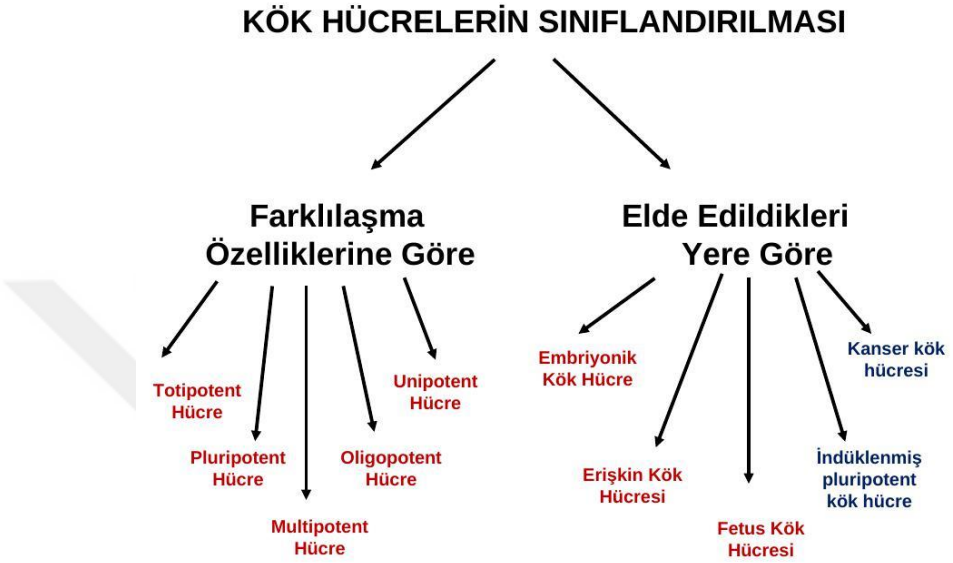
Bu nedenle gelişmiş rejeneratif tedaviler, (1) hasarlı bölgelere doğrudan uygulama için, yani hücre terapisi için veya (2) bu hücreler için taşıyıcı olarak uygun iskeleler kullanılarak doku mühendisliği için kullanılabilen kök hücreler üzerinde yoğunlaşmıştır. Kök hücrelerin kullanımı, farklılaşmış hücrelerin kullanımından daha avantajlı olarak kabul edilir, çünkü kök hücreler daha kolay ve daha büyük miktarlarda elde edilebilir, çok daha yüksek bir çoğalma kapasitesine sahiptir, daha fazla geçişi tolere eder, daha geç yaşlanır, geniş bir istenilen hücre fenotipi yelpazesine farklılaştırılabilir ve ayrıca iskelelerin anjiyogenezini destekler.

Kök hücreler, organ ve dokuların yenilenmesinden ve gelişmesinden sorumlu olan biyolojik sistemlerin organizasyon birimleri olarak tanımlanabilir. Bu hücreler aynı zamanda doğal seçilim yoluyla evrimin birimleri olarak da düşünülebilir. Kök hücreler, kendini yenileme ve çoklu hücre soylarına farklılaşma yeteneğine sahip, klonojenik potansiyele sahip, farklılaşmamış hücrelerdir (Bacakova ve ark., 2018). Kök hücreler doku homeostazisi

ve onarımında kritik öneme sahiptir. Kök hücrelerin farklılaşma potansiyeli kök hücreler arasında farklılık gösterir ve esas olarak kökenlerine bağlıdır. Farklılaşma potansiyellerine göre tüm kök hücreler beş farklı gruba ayrılabilir (Şekil 1.10): 1-Vücuttaki tüm hücre tiplerine farklılaşabilen totipotent; 2-Pluripotent, embriyonik membran hücreleri hariç tüm hücre tiplerini üretebilen; 3-Multipotent kök hücreler, tüm hücre tiplerine olmasa da çoğuna farklılaşabilmektedir; 4-oligopotent hücreler bölünebilir ve kendini yenileyebilir ancak farklılaşma olmadan; 5-unipotent kök hücreler kendi kendini yenileyebilir ve tek bir soy halinde farklılaşabilir. Kök hücreler birçok farklı kaynakta bulunmasına rağmen birçok ortak özelliği paylaşırlarken, farklılaşma hızları, trofik faktörlerin salgılanması ve patolojik koşullar altında endojen sinyal mekanizmaları tarafından uyarılma yetenekleri açısından farklılık gösterirler.

Kök hücreler ileri doku mühendisliği ve hücre tedavilerinde sınırsız bir potansiyele sahiptir (Barzegar ve ark., 2019). Kendini yenileme ve çoklu hücre soylarına farklılaşma özellikleri, kök hücrelerin birden fazla dokuda bozulmuş fonksiyonların onarılmasında arzu edilen kaynaklar olmasını sağlar. Friedenstein MKH'i ilk kez 1974'te tanımladı. MKH, yetişkin kök hücre kategorisine girer ve başlıca özellikleri, kendini yenileme, çok potansiyelli farklılaşma kapasitesi, immünomodülatör özelliklerdir ve bir dereceye kadar immünojenik değildir. MKH, Uluslararası Kök Hücre Araştırmaları Derneği tarafından tanımlandığı gibi fibroblast benzeri bir yapıya sahiptir. Bunlar kolayca kültürle genişletilebilir ve kemik iliği, kas, yağ dokusu, Wharton jeli, diş özü, periferik kan, deri, akciğerler, koryonik villus, adet kanı ve anne sütü gibi birden fazla kökene sahip dokulara sahiptir. MKH'ler, in vitro kültür sisteminde büyümelerini ve birden fazla soy oluşturma yeteneklerini korurken birçok kat genişletebilirler. MKH için pozitif karakterizasyon yüzey belirteçleri CD29, CD44, CD90, CD49a-f, CD51, CD73 (SH3), CD105 (SH2), CD106, CD166 ve STRO-1'dir ve negatif yüzey belirteçleri CD45, CD34, CD14-CD11b, CD79a-CD19 ve HLA-DR yüzey molekülleri'dir. MKH immünomodülatör özelliklere ve oldukça az immünojenik özelliklere sahiptir. Bu, MKH'i çeşitli patolojiler için terapötik ve rejeneratif tıp alanında açıkça arzu edilen bir aday haline getirmektedir (Şekil 1.11). MKH ayrıca doku yaralanmalarını eski haline döndürmede, yenilenmeye yardımcı olmada ve doku dengesini korumada önemli sonuçlar göstermiştir. İmmünoterapi alanında da MKH'in, bağışıklık hücrelerinin çoğalmasına ve aktivasyonuna müdahale ederek bağışıklık sistemini düzenlediği, dolayısıyla doğal ve edinsel bağışıklık sisteminin mekanizmalarını değiştirdiği gösterilmiştir. Farklılaşmış hücrelerle karşılaştırıldığında, kök hücrelerin uygulanmasının

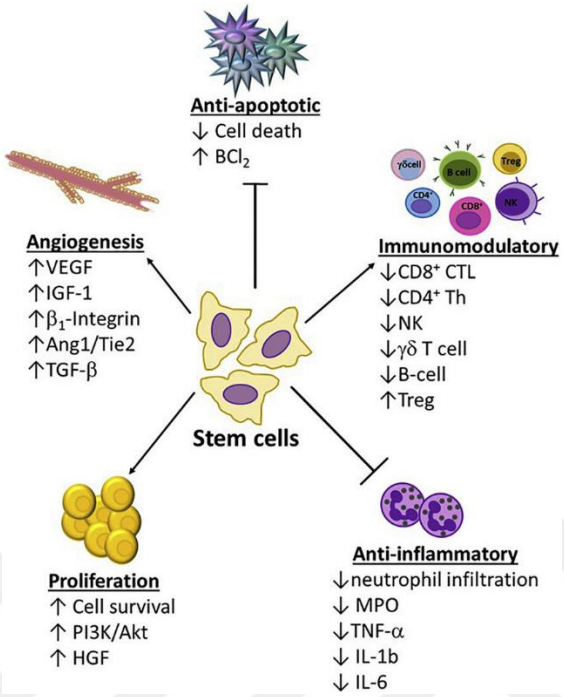
aşağıdaki benzersiz kök hücre özelliklerinden dolayı avantajlı olduğu kanıtlanmıştır: (1) daha fazla sayıda toplama kolaylığı, (2) çok daha yüksek çoğalma kapasitesi, (3) daha büyük bir değişime uğrama yeteneği pasajların sayısı, (4) yaşlanmaya maruz kalma ve ardından geniş bir yelpazede istenen hücre fenotiplerine farklılaşma ve (5) yapı iskelelerinin vaskülarizasyonunu destekleme yeteneği.



Şekil 1.10. Kök hücrelerin sınıflandırılması.

MKH'in birçok kaynağı olmasına rağmen alınabilecek doku miktarı sınırlıdır ve az sayıda hücre toplanabilir. 2018 yılında Mushahary ve arkadaşları, MKH'in farklı doku kaynaklarından farklılaşma potansiyelindeki farklılıkları vurguladı. Yağdan türetilen kök hücreler, şu ana kadar tanımlanan en umut verici kök hücre popülasyonlarından biri haline geldi çünkü bunlar her yerde mevcut ve daha az donör bölgesi morbiditesi ile daha büyük miktarlarda nispeten kolay bir şekilde toplanabiliyor. Deri altı yağ dokusu, çeşitli yağ dokusu türleri arasında klinik olarak en alakalı yağdan türetilen kök hücre kaynağıdır ve karın, uyluk ve koldaki deri altı yağ dokusundan izole edilebilir. Yağ dokusu insan vücudunda nispeten bol olduğundan, kök hücreler daha yüksek sayılarda elde edilebilir. Wharton jeli MKH'leri (WJ-MKH) ise antiinflamatuar ve immünomodülatör özellikleri, onları inflamatuar hastalıkların tedavisi için potansiyel bir aday haline getirmektedir (Drobiova ve ark., 2023). Göbek kordonu dokusu, düşük immünojeniteye sahip olan WJ-MKH'in kaynağıdır ve alıcının bağışıklık sistemi tarafından kemik iliği-MKH'e göre reddedilme olasılıkları daha düşüktür. Diğer MKH türleri ile karşılaştırıldığında, WJ-MKH'lerin daha yüksek çoğalma hızı, artan anti-inflamatuar ve immünomodülatör özellikler ve daha düşük immünojenite gibi

çeşitli avantajları vardır. Bu özellikler WJ-MKH'i inflamatuar hastalarının tedavisi için umut verici bir seçenek haline getirmektedir.



Şekil 1.11. Kök hücrelerin parakrin fonksiyonları.

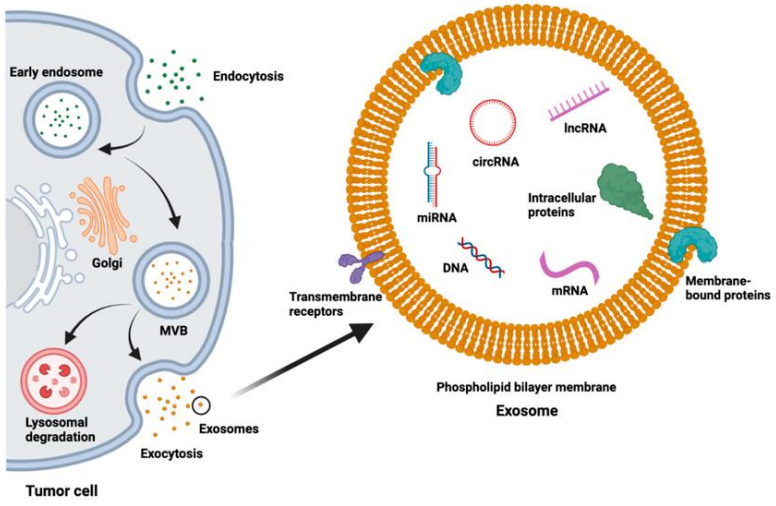
Klinik denemeleri içeren MKH transplantasyonunda hedef dokunun fonksiyonları iyileşse de MKH'in önemli bir çoğalması yoktu, bu da MKH transplantasyonuna dayalı tedavilerin kullanılmasıyla ilgili soruları gündeme getiriyor. Hayatta kalan birkaç hücre genellikle enjeksiyon bölgesinde kalır ve bazen çoğalır, ancak çoğu konakçı dokuyla düzgün bir şekilde bütünleşmekte ve fonksiyonel iyileşmeye katkıda bulunmakta başarısız olmaktadır. Kemik iliği ve merkezi sinir sistemindeki önemli deneyler, ana sınırlamaların nakledilen hücrelerin hayatta kalması ve entegrasyonu ile konakçı doku ortamı tarafından sunulan engeller olduğunu göstermiştir. Dahası, başarılı transplantasyon ve doku rejenerasyonu için en uygun hücre tipinin belirlenmesi henüz mümkün değildir (Mitrousis ve ark., 2018). Birçok çalışma, MKH tarafından salgılanan moleküllerin işbirlikçi hareketine bağlı olarak hücre hasarının azaldığını ve doku onarım kapasitesinin arttığını açıklamıştır. Ana hücrelerin bitişikliği gerekli değildir çünkü onlar tarafından salınan çözünür moleküller hedef bölgeye taşınır. Ön aşamalarda, MKH yerel aşılamada ve bunları çeşitli doku türlerine ayırmada kullanılıyordu, ancak yine de MKH'in faydaları geniş potansiyellerle araştırıldı. Bu faydaların üretilen çok sayıda biyolojik olarak aktif faktörden kaynaklanabileceği ve bu faktörlerin herhangi bir biyolojik sürecin kritik aracıları olduğu ortaya çıktı. Günümüzde, hücreler arasında salgılanan materyaller aracılığıyla iletişimi içeren ve birleştirilmiş

sekretom olarak bilinen yeni bir tür biyolojik direktif, MKH bazlı tedavilerin geleneksel bilgisini devralmıştır. Bir hücrenin ortamı, normal ve hastalıklı koşullar altında fizyolojisinin yönlendirilmesinde önemli bir rol oynar. Yaşamsal fonksiyonların çoğalması ve verimli bir şekilde yerine getirilmesi için uygun ve yeterli koşulları sürdürmek için tüm hücreler, salgı mekanizmasıyla birlikte bir hücrenin sekretomunu oluşturan çok sayıda salgı molekülü salgılar. Büyüme kültürü ortamına salınan salgı molekülleri, normal fizyolojik fonksiyonları için önemli olan hücre-hücre etkileşimlerine yardımcı olur. Sekretom, salgılanan tüm proteinleri, enzimleri, organik bileşikleri, büyüme faktörlerini, sitokinleri, metabolitleri, nörotransmitterleri ve hormonları oluşturur. Genellikle bu maddeler diğer hücrelerle iletişimi kolaylaştırmak ve hücre dışı matriks yapısını ve içeriğini etkilemek için salgılanır. Bu bileşenler herhangi bir hücrenin altında yatan koşullar hakkında yeterli bilgi sağlayabilir. Şartlandırılmış ortam ve eksozomlar gibi sekretom türevleri, az bakım gerektirdiğinden ve daha iyi bir raf ömrüne sahip olduğundan, doğrudan hücre bazlı tedavilere göre önemli avantajlara sahiptir. Güvenli ve verimli hücre bazlı ürünler elde etmek için üretim ve kalite kontrol için yasal gerekliliklere ihtiyaç vardır. Ekzojen olarak uygulanan çok sayıda MKH'nin, mekanik stres ve destekleyici niş eksikliği nedeniyle bağışıklık sistemi reaksiyonundan bağımsız olarak elimine edildiğini belirtmek dikkate değerdir. Bununla bağlantılı olarak bu dezavantajlar, araştırmacıları kök hücre temelli tedavilerin diğer yönlerine odaklanmaya zorladı (Rezabakhsh ve ark., 2021).

1.3. Eksozomlar

Eksozomlar, çapı 30-200 nm arasında değişen membranöz hücre dışı keseciklerdir (Hade ve ark., 2021). Eksozomların, bağışıklık hücreleri (B hücreleri, T hücreleri, mast hücreleri, dendritik hücreler), nöronal hücreler, epitel hücreleri, endotel hücreleri, embriyonik hücreler, kanser hücreleri ve mezenkimal kök hücreler (MKH) dahil olmak üzere çoğu hücre türü tarafından salgılandığı bulunmuştur. "**Hücre dışı vezikül**" terimi genel olarak eksozomlar, mikropartiküller ve apoptotik cisimcikler dahil olmak üzere çeşitli vezikül türlerini kapsar. Bununla birlikte, "eksozom" kelimesi özellikle hücreler içindeki multiveziküler cisimciklerin içinde oluşan kesecikleri ifade eder (Stremersch ve ark., 2016). Eksozomlar hayati bilgileri ve makromolekülleri köken kaynaklarından taşırlar ve bu nedenle hücre-hücre iletişiminde önemli bir role sahiptirler. Bu makromoleküller çeşitli proteinler, enzimler, transkripsiyon faktörleri, lipitler, hücre dışı matriks proteinleri, reseptörler ve nükleik asitlerden oluşur ve eksozomal yüzeyin hem içinde hem de dışında

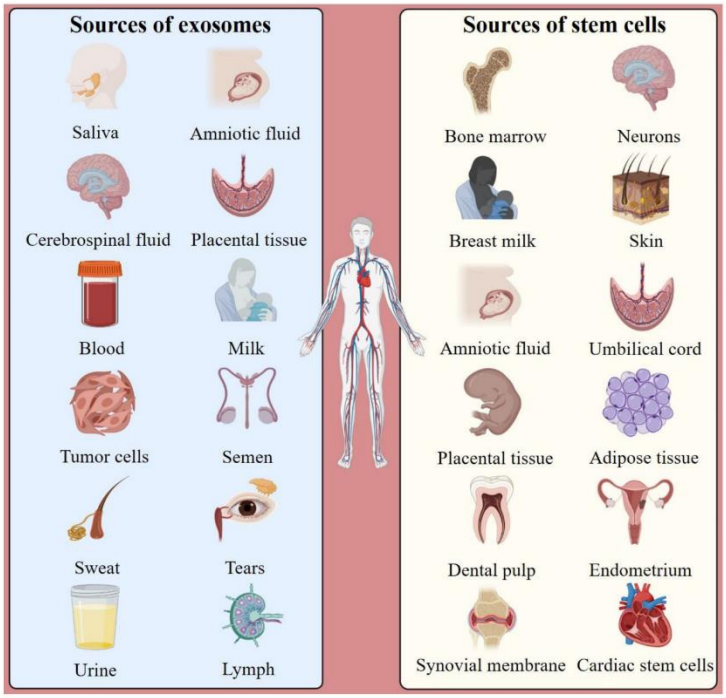
bulunabilir (Şekil 1.12). Eksozomlar, idrar, kan, serum, anne sütü, amniyotik sıvı, beyin omurilik sıvısı, malign asit, tükürük, safra ve lenf gibi sıvılar dahil olmak üzere hem sağlıklı hem de hastalık koşullarındaki hemen hemen tüm vücut sıvılarında tespit edilmiştir (Şekil 1.13).



Şekil 1.12. Tipik eksozomlar. Pleiotropik işlevlere sahip, insan vücudundaki yerel ve uzak hücreler arasında güçlü bir iletişim sistemi. Eksozomlar, proteinler, nükleik asitler, lipitler, enzimler ve metabolitler dahil olmak üzere terapötik yükleri taşıyan MKH'ler gibi hücreler tarafından salgılanan bir tür hücre dışı veziküldür (Yu ve ark. 2023).

Eksozomlar **ilk olarak** Pan ve Johnstone tarafından koyun retikülositlerinin eritrositlere olgunlaşma mekanizmalarını araştırırken keşfedilmiştir (Pan ve Johnstone, 1983). Araştırmacılar, retikülositlerden salınan ve retikülosit kökenli lipitler, proteinler ve enzimler içeren bir tür kesecik (daha sonra buna "eksozom" adını verdiler) keşfettiler (Johnstone ve ark., 1987). Eksozomların başlangıçta hücresel enkaz veya çöp imhası olduğu varsayılmış ve hücre ölümünün işaretleri olarak kabul edilmiştir. Keşfedilmelerinden bu yana, eksozomların biyolojisini, işlevini ve potansiyel klinik kullanımlarını belirlemek için kapsamlı araştırmalar yürütülmüştür. Artık eksozomların, hücre içi iletişim ve ana hücre ile çevredeki hücreler arasındaki genetik materyal ve protein değişimi dahil olmak üzere çeşitli biyolojik fonksiyonları gerçekleştirmek için donör hücreler tarafından hücre dışı ortama salındığı tespit edilmiştir. Eksozomların klinik önemi, kanser immünoterapisinde lipozom aracılı ilaç dağıtımına alternatif olarak kullanılmalarıyla ortaya konmuştur. Eksozomlar ayrıca mikroRNA ve mRNA içerikleri nedeniyle umut verici bir biyolojik gen dağıtım sistemidir. Ancak eksozomların hala tam olarak anlaşılmamış veya karakterize edilmemiş birçok yönü vardır. Örneğin, kanser tedavisi için birçok potansiyel hedef tümöre özgü biyobelirteçler olduğundan, tümör hedefleme tedavileri geliştirmek için eksozomların

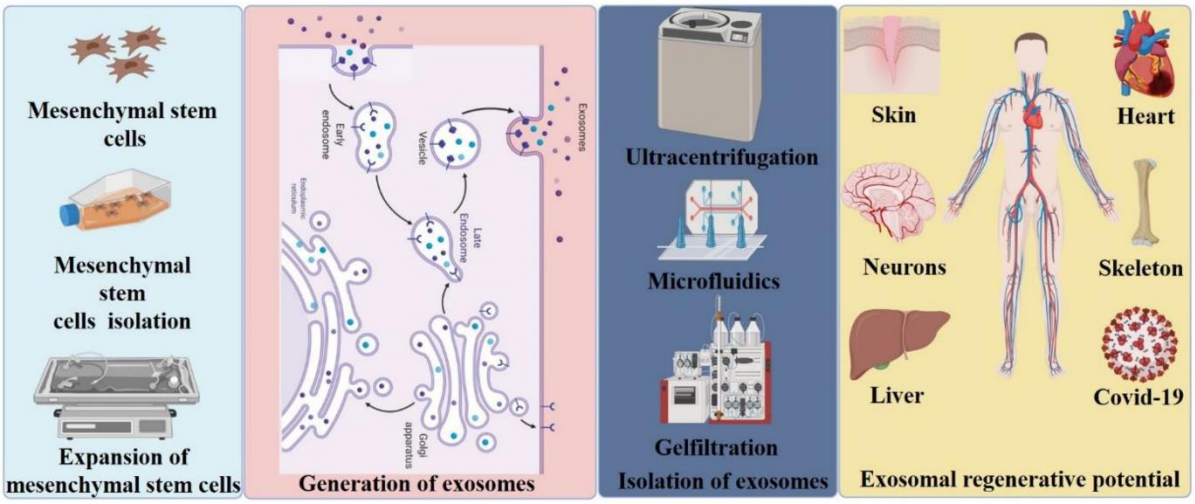
yüzeyinde bulunan biyobelirteçleri incelemek çok önemlidir (Min ve ark., 2019). Bu küçük harika keseciklerin gen aktarımına, hastalık teşhisine, hücre içi iletişime, ilaç dağıtımına ve biyobelirteç odaklı tedavilere yardımcı olma konusundaki büyük potansiyeli, giderek araştırmacıların dikkatini çekti.



Şekil 1.13. Eksozom ve kök hücre kaynakları. Eksozomlar, amniyotik sıvı, idrar, beyin omurilik sıvısı, kan, serum, anne sütü, malign asit, tükürük, safra vb. dahil olmak üzere hemen hemen tüm vücut sıvılarında tespit edilmiştir. MKH hematopoietik olmayan, multipotent, yetişkin kök hücrelerdir ve kemik iliğinden, göbek kordonundan, plasenta dokusundan, yağ dokusundan, diş pulpasından, nöronlardan, deriden, anne sütünden vb. izole edilir (Yu ve ark. 2023).

Kök hücre tedavileri hastalıkların tedavisinde giderek ivme kazanmış; son yıllarda yapılan araştırmaların çoğu, MKH'in uygulanmasının potansiyel önemine odaklanmıştır (Bjørge ve ark., 2018). MKH hematopoetik olmayan, multipotent, kemik iliği, göbek kordonu, yağ dokusu, beyin, dalak, böbrek ve karaciğer gibi birçok biyolojik kaynaktan izole edilebilen yetişkin kök hücrelerdir. MKH adipositlere, kondrositlere ve osteositlerin yanı sıra endodermal (hepatositler) ve ektodermal soylara (nörositler) farklılaşabilir. Mekanik farklılaşma özelliklerine ek olarak MKH ayrıca sitokinler, kemokinler ve büyüme faktörleri dahil olmak üzere eksozomlar ve biyomoleküller de salgılar. İlk raporlar MKH'in doku onarımında kritik bir rol oynayabileceğini gösterse de araştırmalar MKH'in hasarlı doku alanlarında hayatta kalma oranının düşük olduğunu ve düşük aşılama potansiyelinin olduğunu, bunun da doku onarımında MKH etkinliğini sınırladığını göstermiştir (Lou ve

ark., 2021). Daha ileri çalışmalar, MKH uygulamalarının onarımdaki yararlı etkilerinin, eksozomlar gibi salgılanan kesecikleri içeren parakrin sinyallemesine atfedilebileceğini göstermiştir. İlginç bir şekilde, çeşitli çalışmalar MKH tarafından salgılanan eksozomların, çeşitli yaralanma ve hastalık modellerinde MKH bazlı kök hücre tedavilerinin yerini alabileceğini göstermektedir (Bjørge ve ark., 2018). Örneğin, MKH'den türetilen eksozomların, yara iyileşmesi ve miyokard enfarktüsünün fare modellerinde onarımı tetiklediği gösterilmiştir. Özellikle araştırmalar, plasental göbek kordonu MKH'i tarafından salgılanan eksozomların yara iyileşmesi ve doku rejenerasyonunda önemli bir rol oynadığını ortaya çıkarmıştır (Bakhtyar ve ark., 2017). Benzer şekilde, son birkaç on yılda yapılan çalışmalar MKH-eksozomlarının nörolojik, solunum, kıkırdak, böbrek, kalp ve karaciğer hastalıkları, kemik onarımı ve kanser gibi çeşitli bağlamlarda avantajlı etkilere sahip olabileceğini göstermiştir (Şekil 1.14).



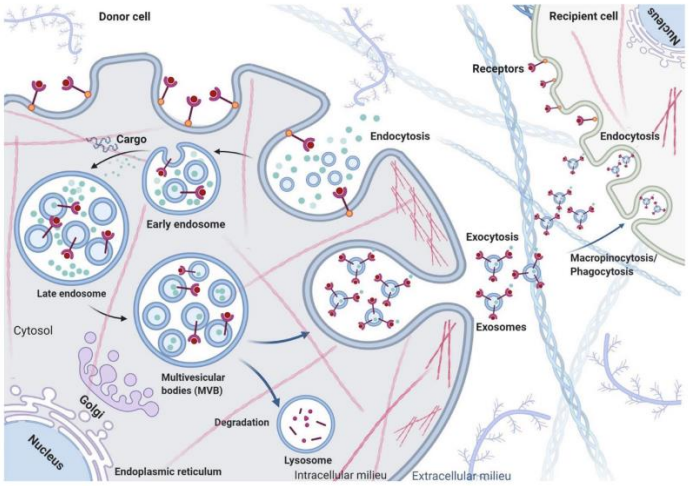
Şekil 1.14. MKH'den türetilmiş eksozom metodolojisi. MKH'in izolasyonunun grafiksel gösterimi, eksozom biyogenezi, eksozomların izolasyonu ve rejeneratif tıpta eksozomların terapötik uygulamaları (Yu ve ark. 2023).

Kısacası MKH-eksozomları, kök hücre içermeyen rejeneratif tıp için ekzojen kimyasalların ve biyomoleküllerin taşınması yoluyla akıllı bir ilaç dağıtım yaklaşımı olarak hizmet edebilir. MKH-eksozomları, sentetik nanopartiküller, lipozomlar, tek moleküller ve hücrelerle karşılaştırıldığında birçok potansiyel terapötik avantaja sahiptir. Bu, onların daha küçük boyut, daha düşük karmaşıklık, nukleus eksikliği (böylece neoplastik dönüşümü önleme), artan stabilite, daha kolay üretim, daha uzun koruma ve biyomoleküllerin taşınması için proteinleri, küçük molekülleri veya RNA'ları yükleme potansiyeli gibi yeni faydalı özelliklerinden kaynaklanmaktadır. MKH-eksozomları ayrıca terapötik yükleri belirli organlara, dokulara ve hücrelere aktarmak için farklı antikorlar veya yüzey reseptörleri

gösterecek şekilde de değiştirilebilir. Ek olarak MKH-eksozomları, çok sayıda biyolojik molekül türüne ev sahipliği yaparak, geleneksel küçük moleküllerle gerçekleştirilemeyen çeşitli terapötik yaklaşımlara aynı anda katılmalarını sağlar.

Eksozomların diğer dağıtım araçlarına göre potansiyel avantajları: Eksozomların diğer dağıtım araçlarıyla bazı benzerlikleri olduğu göz önüne alındığında, sulu bir çekirdeği saran özel bir çift lipit membrana sahiptirler (Rezai ve ark., 2017). Yüklerini hedef bölgelere ulaştırmak için potansiyel olarak hem hidrofilik hem de lipofilik malzemelerle yüklenebilirler. Bu özellik, eksozomların, daha önce lipozomlar için açıklanan sınırlamaların bazılarını aşmasını sağlar. Eşsiz bir varlığa sahip olmaları sayesinde eksozomlar biyolojik sıvılarda kolaylıkla dağılır, sistemik dolaşımda uzun süre kalır ve fizyolojik bariyerler yoluyla alıcı hücreler tarafından içselleştirilir. Sadece büyük hacimlerde biyomolekül içeren eksozomlar immünoreaktif yanıtları tetiklemez, aynı zamanda hedef dokular yerine karaciğer veya akciğerde birikmezler.

Eksozom Biyogenezi, Salgısı ve Alımı: Eksozomların yapısı ve bileşimi, donör hücresi, mikro çevre ve fizyolojik koşullar dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlıdır. Eksozomlar, ekzositoz süreci yoluyla endozomal veziküllerden oluşturulur (Şekil 1.15). Kargo taşıyıcıları olarak eksozomlar proteinleri, peptitleri, nükleik asitleri ve lipitleri taşıyabilir. Eksozomların protein bileşimini araştıran çalışmalar, bazı proteinlerin spesifik olarak ebeveyn dokusundan kaynaklandığını, bazılarının ise eksozomlara özgü olduğunu göstermiştir. Eksozomların içerdiği spesifik proteinler arasında endozom, plazma zarı ve sitoplazmada bulunanlar bulunur ve bu da diferansiyel seçilimi gösterir. Ek olarak, çeşitli çalışmalar eksozomların mikroRNA, haberci RNA ve kodlamayan RNA gibi farklı RNA türlerini içeren nükleik asitleri taşıdığını göstermiştir (Dilsiz, 2020; Wang ve ark., 2019). İlginçtir ki eksozomlardaki proteinlerin, peptidlerin ve nükleik asitlerin bileşimi donör hücre tiplerinden bağımsızdır; Öte yandan eksozomlardaki lipit bileşimi öncelikle eksozom üreten hücrelere bağlıdır. Tipik olarak eksozomlar, sfingomiyelin, doymamış fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin, doymamış fosfatidilkolin, kolesterol, GM3 ve gangliosid dahil olmak üzere plazma membran lipitlerini içerir.



Şekil 1.15. Eksozom biyogenezi, salgılanması ve alımı. Hücre dışı ortam, endositoz süreci yoluyla hücreye giren proteinler, lipitler, küçük moleküller ve çok sayıda metabolit dahil olmak üzere çeşitli bileşenlerden oluşur. Bu süreç erken endozomların oluşumuna yol açar; Kargo, zarın içe doğru tomurcuklanması üzerine multiveziküler cisimlerin içindeki intralüminal keseciklere sarılır. Ayrıca, erken endozomlar geç endozomlara dönüşür ve bunlar daha sonra multiveziküler cisimlerin oluşmasına neden olur. Modifiye edilmiş multiveziküler cisimler, hücre dışı ortam ve sitoplazmik yapılardan oluşan bir kargoya sahiptir. Multivesiküler cisimler ve bunların eksozomal içerikleri iki ana yolu izleyebilir. İlkinde otofagozomlarla birleşebilirler ve lizozomlar yoluyla bozunma yolunu takip edebilirler. İkinci yolda, çoklu kesecikli cisimler mikrotübül ve hücre iskeleti ağı yoluyla plazma zarına kaynaşabilir ve hücre zarından tomurcuklanarak serbest bırakılabilir. Ayrıca, ekzositoz yoluyla salınan eksozomlar, ilgili yüzeylerindeki hücre sinyal molekülleri aracılığıyla alıcı hücrelerle etkileşime girer. Eksozomlar ayrıca endositoz, makropinositoz, fagositoz ve plazma membranlarının doğrudan füzyonu gibi farklı mekanizmalar kullanılarak alıcı hücrelere girebilir. Eksozom biyogenezinde, salgılanmasında ve alımında çeşitli proteinler yer alır; bunlar arasında ESCRT, AAA ATPazlar, ESCRT ile ilişkili protein, SNARE'ler, Rab'ler ve diğer enzimler bulunur (Hade ve ark., 2021).

Eksozomların biyogenezi **ekzositoz** yoluyla gerçekleşir (Hade ve ark., 2021): Eksozom biyogenezi, salgılanması ve alımının bir tasviri Şekil 4'te ayrıntılı olarak verilmiştir. Eksozomlar, multiveziküler endozomlardan üretilir; genel olarak multiveziküler endozomların intralüminal vezikülleri, hidrolazlar tarafından lizozomal bozulmaya maruz kalır. Bununla birlikte, multiveziküler cisimler gibi kaçan multiveziküler endozomlar, doğrudan hücresel plazma zarı ile birleşebilir ve tomurcuklanma süreci yoluyla daha sonra eksozomlar olarak hücre dışı ortama salgılanır. Burada eksozomlar parakrin sinyalleme yoluyla pleiotropik işlevlere sahiptir. Şu anda eksozomların farklı popülasyonlara ayrılmasının altında yatan mekanizma hakkında çok az şey biliniyor. Çalışmalar, multiveziküler cisimlerin spesifik olarak lizozomal ilişkili membran proteini 1, 2 ve 3 (LAMP-1, -2, -3), tetraspaninler ve bir grup farklılaşma faktörü (CD-107a, CD-107b, CD-208 veya CD-63), geç endozomlar ise majör doku uyumluluk kompleksi (MHC) sınıf II'ye

sahiptir. Hanson ve Cashikar, multiveziküler cisimlerin morfogenez mekanizmasını araştırdılar ve taşıma için gerekli olan endozomal sıralama kompleksinin (ESCRT), hem ekzozomal hem de ektozomal biyogenezi yönlendirmede çok önemli bir rol oynadığını buldular (Hanson ve ark., 2012). ESCRT, vakumlu protein sınıflandırmayla ilişkili protein 4 (VPS4), vezikül trafiği 1 ve apoptoz bağlantılı gen ile birlikte ESCRT-0, -I, -II ve -III olmak üzere dört makine kompleksi halinde organize edilen yaklaşık 30 farklı protein içerir. 2-etkileşimli protein X (Alix) aynı zamanda programlanmış hücre ölümü olarak da adlandırılan altı etkileşimli proteindir. İlk ESCRT-0 kompleksi, lizozomal bozunma için öngörülen her yerde bulunan hücre içi kargoların tanınmasına ve sınıflandırılmasına yardımcı olur. ESCRT-I ve -II, zarın sekestre veziküller içeren tomurcuklar halinde deforme olmasına katkıda bulunurken, ESCRT-III veziküllerin kesilmesinde rol oynar. ESCRT'den bağımsız biyogenez mekanizmalarının, eksozomal belirteçler olarak tanımlanan tetraspaninleri (CD63, CD9, CD37, CD82 veya CD81) içerdiği öne sürülmektedir. Bu proteinler hücre dışı vezikül biyogenezinde hayati önem taşır ve hücre dışı vezikül salgılanması ve reseptör hücreler tarafından alınması için gereklidir. Sfingomyelinin seramide hidrolizinin de eksozomların biyogenezine katkıda bulunduğu bilinmektedir.

1.3.1. Eksozomlar için İzolasyon Yöntemleri

Geleneksel eksozom izolasyon yöntemi, eksozomları yoğunluk ve boyuta göre ayıran diferansiyel ultrasantrifüjlemedir (Joo ve ark., 2020). Bu yöntem, eksozomları büyük hacimli biyolojik sıvılardan izole ederken kolay, uygun maliyetli ve avantajlıdır. Bununla birlikte, bu yöntemin özgüllüğü yoktur, dolayısıyla eksozomlar benzer çaplara sahip diğer hücre dışı keseciklerle kirlenmiş olabilir. İzole edilmiş eksozomların saflığını arttırmak için, iyodiksanol veya sükroz yastıkları ile birlikte diferansiyel ultrasantrifüjleme kullanılır. Eksozomlar filtreleme yoluyla da izole edilebilir. Hücre artıkları ve büyük moleküller uzaklaştırıldıktan sonra, süzüntü küçük kirletici maddeleri ortadan kaldırmak için ultra filtreden geçirilebilir. Filtrasyon yöntemleri, izolasyon için gereken zamanı ve çabayı azaltabilir. Bununla birlikte, eksozomlar filtrenin gözenek boyutuna göre izole edildiğinden, eksozomları apoptotik cisimler veya benzer çaplara sahip mikrokabarcıklar gibi kirletici maddelerden ayırmak zordur.

İzole edilmiş eksozomların saflığını arttırmak için immünoafinite kromatografisi kullanılabilir. Bu yaklaşımda, sütundaki antikorlar, eksozomların spesifik yüzey ligandlarına bağlanarak eksozomları yakalar. Bununla birlikte, aynı anda yalnızca küçük numune

hacimleri yüklenebildiği için immünoafinite kromatografisi, büyük numune hacimlerinden eksozomların saflaştırılması için uygun değildir. Filtrasyon yöntemi gibi, boyut dışlama kromatografisi de eksozomları boyutuna göre izole eder, ancak içinde eksozomların yakalanabileceği gözeneklere sahip boncuklar kullanır. Boncuklar tarafından yakalanamayan büyük parçacıklar kolondan geçer. İzole edilmiş eksozomları konsantre etmek için çökeltme kullanılabilir. Bununla birlikte, kimyasal işlemler eksozomlara zarar verebileceğinden veya diğer molekülleri birlikte çökeltebileceğinden, çökeltilmiş eksozomlar daha ileri fonksiyonel uygulamalar için kullanılamaz. Her izolasyon yönteminin kendi artıları ve eksileri olmasına rağmen, yöntemlerin kombinatoryal olarak kullanılmasıyla sınırlamaları kısmen hafifletilebilir hem verim hem de saflık arttırılabilir. Tablo 1.1, eksozom izolasyon yöntemlerinin bir özetini ve karşılaştırmasını sağlar.

Tablo 1.1. Eksozom izolasyon yöntemlerinin özeti (Joo ve ark. 2020).

Metodlar	**İlkeler ve Materyaller**	**Avantajlar**	**Dezavantajlar**	**Uygulamalar**
Ultrasantrifüjleme	Fiziksel yöntem	-Düşük maliyetli -Büyük hacimlerden saflaştırmaya izin verir -Eksozomları sağlam tutar	-Düşük verim -Düşük saflık	-Nükleik asitlerin analizi, biyobelirteçler -Yüklerin kapsüllenmesi
Ultrafiltrasyon	Filtreleri kullanan fiziksel yöntem	-Daha az zaman/çaba -Yüksek verim -Eksozomları sağlam tutar	-Düşük saflık -Eksozomların deformasyonu	-Nükleik asitlerin analizi, biyobelirteçler
İmmünoafinite kromatografisi	Antibiyotikleri kullanan kimyasal yöntem	-Yüksek verim	-Büyük hacimlerle uyumlu değil	-Nükleik asitlerin,

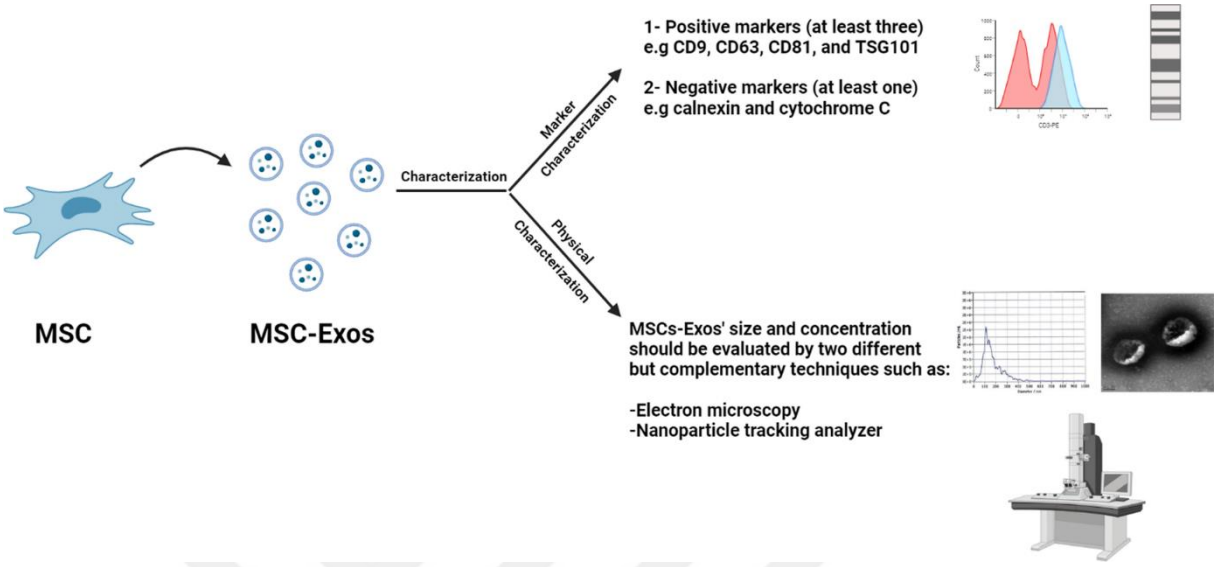
		-Yüksek saflık	-Zaman tükeniyor -Yüksek fiyat	proteinlerin analizi
Boyut dışlama kromatografisi	Gözenek boncuklarıyla doldurulmuş sütunların kullanıldığı fiziksel/kimyasal yöntem	-Yüksek verim -Ekozom toplanmasını azaltır -Eksozomları sağlam tutar	-Numuneler seyreltilebilir -Zaman tükeniyor	-Nükleik asitlerin, biyobelirteçlerin, proteinlerin analizi -Yüklerin kapsüllenmesi
Presipitasyon	Fiziksel/Kimyasal yöntem	-Yüksek verim -Kolay -Seyreltilmiş numuneleri konsantre eder	Downstream uygulamalar için sonradan temizleme gereklidir	-Nükleik asitlerin analizi, biyobelirteçler

1.3.2. MKH-eksozomlarının karakterizasyonu

Klinik çalışmalarda kullanılması amaçlanan MKH-eksozomlar, MISEV2018 kılavuzlarında belirtildiği gibi hem işaretleyici hem de fiziksel karakterizasyonları içeren hücre dışı veziküllere yönelik minimum karakterizasyon kriterlerini karşılamalıdır (Lotfy ve ark., 2023). Marker karakterizasyonu, (i) en az bir -transmembran/lipid bağlı protein -sitosolik protein dahil olmak üzere ekstraveziküllerin en az üç protein belirteci için pozitif ve (ii) en az bir protein belirteci için negatif olarak değerlendirilmelidir. MKH-eksozomlarının boyutunu ve konsantrasyonunu değerlendirmek için fiziksel karakterizasyon, elektron mikroskobu ve tek parçacık analizörleri gibi iki farklı fakat tamamlayıcı teknikle değerlendirilmelidir (Thery vd., 2018).

Birçok çalışma, tüm MKH-eksozomların CD9, CD63, CD81 ve TSG101 belirteçlerini paylaştığını ve kalneksin ve sitokrom C'yi eksprese etmediğini bulmuştur. Bu nedenle,

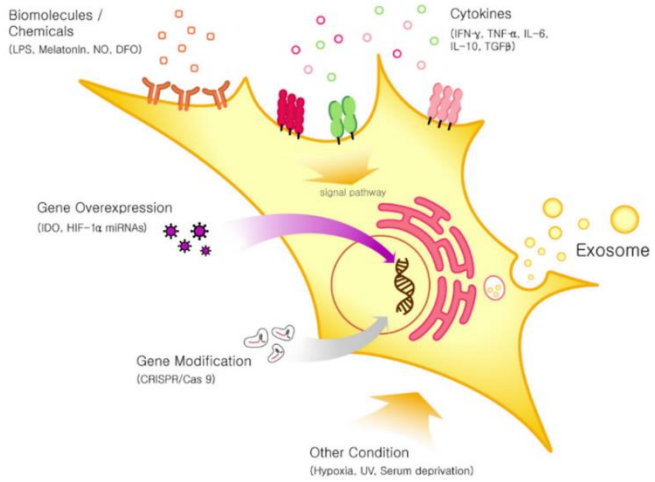
MKH-eksozomlar ile ilgili yayınlanmış çalışmaların çoğu, MKH-eksozom karakterizasyonu için bu belirteçleri ve ayrıca fiziksel özellikleri değerlendirmek için elektron mikroskobu ve nanopartikül izleme analizörünü kullanmıştır (Şekil 1.16).



Şekil 1.16. MKH-eksozomları için karakterizasyon adımlarının özeti (Joo ve ark., 2020).

1.3.3. Eksozomların Terapötik Etkinliğini Arttırmaya Yönelik Ön Koşullandırma Yaklaşımları

Yukarıda açıklandığı gibi MKH'den türetilen eksozomlar, çeşitli hastalık modellerinde terapötik etkiler gösterir (Joo ve ark., 2020). Eksozom özellikleri, türetildikleri MKH'in durumuna bağlı olarak değiştiğinden ve MKH durumu dış uyaranlara yanıt olarak değiştiğinden, çeşitli çalışmalar, ön koşullandırma MKH'inin eksozomların terapötik aktivitelerini geliştirip geliştiremeyeceğini araştırmıştır. Eksozomlar için ideal verim ve terapötik kaliteye ulaşmak, eksozomların klinik uygulamalarında en önemli zorluklar arasındadır. **Bu bağlamda,** MKH'in sitokinler, hipoksi ve kimyasallarla ön koşullandırılmasının bunların immünsüpresif, immünomodülatör ve rejeneratif etkilerini iyileştirdiği gösterilmiştir (Noronha ve ark., 2019). Ayrıca MKH'in gen ve hücre yüzeyi modifikasyonu bunların terapötik etkinliğini artırabilir. Eksozom aktivitesini doğrudan veya dolaylı (MKH fonksiyonunu artırarak) olarak artıran ön koşullandırma yaklaşımlarının her ikisi de MKH'den türetilmiş eksozomların terapötik potansiyelini en üst düzeye çıkarmak için kullanılabilir (Şekil 1.17).



Şekil 1.17. Eksozomların salgılanmasını ve terapötik etkinliğini arttırmak için MKH'e yönelik ön koşullandırma yaklaşımları. LPS: lipopolisakkaritler; NO: nitrik oksit; DFO: deferoksamin; IFN: interferon; TNF: tümör nekroz faktörü; IL: interlökin; TGF: dönüştürücü büyüme faktörü; İDO: indoleamin-pirol 2,3-dioksijenaz; HIF: hipoksi ile indüklenen faktörler; miRNA'lar: mikro RNA'lar; UV: ultraviyole (Joo ve ark., 2020).

1.3.3.1. MKH'in Ön Şartlandırılması: Eksozom Üretiminin Artırılması

MKH'den eksozom üretiminin arttırılması, karşılanmayan acil bir tıbbi ihtiyaçtır. Bu nedenle eksozom üretimini artıran ön koşullandırma yaklaşımları önemlidir. Bir rapor, 3 boyutlu kültür tekniklerinin arzu edilen etkilere sahip olduğunu gösterdi. MKH genellikle MKH fizyolojik nişinde bulunan koşulların bulunmadığı plastik plakalardaki 2 boyutlu yüzeylerde kültürlenir. Bunun yerine 3 boyutlu gözenekli iskele yapısının kullanılması MKH'den eksozom üretimini arttırdığı; dahası, eksozomların bir sıçan beyin hastalığı modelinde terapötik etkileri iyileştirdiği görülmüştür (Phan ve ark., 2018). Eksozom üretimini arttırmak için biyoreaktörler ve mikro taşıyıcılar tarafından büyük ölçekli MKH genişletmeleri kullanılabilir (Mendt ve ark., 2018). Başka bir yaklaşım, klorür tuzları içeren vezikülasyon tamponlarının, ozmotik stres yoluyla Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinden ekstrasüler vezikül üretimini arttırdığını gösterdi (Del Piccolo ve ark., 2012). 1 ila 2 μm gözenekli polimer filtrelerin kullanılması, hücrelerin ekstrüde edilmesiyle eksozom üretimini geliştirmiştir (Wu ve ark., 2012). Ekstrasüler veizküllerin üretimi sitokalasin B'nin tedavi edilmesiyle de arttırılmıştır (Pick ve ark., 2005). İlginçtir ki, sitokalasin B ile tedavi edilen MKH'den eksozomların transplantasyonu, MKH'in transplantasyonunda olduğu gibi anjiyojenik aktiviteler göstermiştir (Gomzikova ve ark., 2019). Eksozom biyogenezinde yer alan faktörleri uyaran kimyasalların kullanıldığı ön koşullandırma çekici bir yaklaşım olabilir. Bir çalışma, antifungal reaktiflerin prostat kanseri hücrelerinde eksozom üretimini

arttırdığını buldu (Datta ve ark., 2018). Bu durumda, modifiye imidazol nitrefazol (20 μm), C4-2B hücre hattından eksozom üretimini önemli ölçüde arttırdı. Nitrefazol, multiveziküler cisimciklerekzositozunu düzenleyen bir protein olan Rab27a seviyesini arttırdı. Nitrefazol ve başka bir azol olan pentetrazol ile tedavi, eksozom biyogenezi ile ilişkili moleküller Alix ve nSMase2'nin seviyelerini önemli ölçüde arttırdı. Bu tedavi aynı zamanda p-ERK seviyesini de arttırdı. Bu veriler, bir azolün, eksozom biyogenezini ve salınımını modüle ederek MKH'den eksozom üretimini arttırmaya aday olabileceğini göstermektedir (Datta ve ark., 2018). Gen düzenleme, MKH'den eksozom üretimini arttırmanın başka bir etkili yolu olabilir. Eksozom biyogenezi ve sekresyonunda yer alan çeşitli genler, kodlanan proteinleri aşırı eksprese edecek veya fonksiyonlarını devre dışı bırakacak şekilde değiştirilebilir (McAndrews vd., 2019). Örneğin, fosfolipaz D2'nin aşırı ekspresyonu, eksozom sayısında iki kat artışa yol açmıştır (Laulagnier vd., 2004).

1.3.3.2. MKH'lerin Sitokinlerle Ön Koşullandırılması

Son çalışmalar, interferon (IFN)-γ, TNF-α, IL-1β, IL-6 ve TGF-β gibi proinflamatuar sitokinlerin MKH'in terapötik fonksiyonlarını etkili bir şekilde arttırdığını ortaya çıkardı. MKH'in IFN-γ ile ön koşullandırılması, anti-inflamatuar proteinler, nöroprotektif proteinler ve anti-inflamatuar RNA'lar açısından zenginleştirilmiş eksozomlar üreten hücreleri (IFN-γ ile hazırlanmış MKH'ler olarak adlandırılır) uyarır (Harting ve ark., 2018). IFN-γ ile hazırlanmış MKH'den türetilen eksozomlar, bir deneysel otoimmün ensefalomiyelit fare modelinde multipl sklerozun çeşitli semptomlarını hafifletti. Aktive edilmiş periferik kan mononükleer hücreleri, IFN-y ile hazırlanmış MKH'den gelen eksozomlarla kültürlendiğinde, periferik kan mononükleer hücre proliferasyonu ve pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-6, IL-22) seviyesi azaldı. Buna karşılık, IDO gibi immünosüpresif sitokinlerin seviyesi arttı (Riazifar ve ark., 2019). Başka bir çalışma, IFN-γ ile prime edilmiş MKH'den ekstraselüler vezikülleri test etti. IFN-y ile prime edilmiş MKH'den gelen ekstraselüler veziküllerle kültürlendiğinde, bir THP-1 hücre hattının fagositik ve bakteriyel öldürme aktivitesi arttırıldı. Ayrıca, IFN-y ile hazırlanmış MKH'den elde edilen ekstraselüler veziküller, E. coli'nin neden olduğu pnömoni fare modelinde Escherichia coli'nin neden olduğu akciğer hasarını hafifletmektedir (Varkouhi ve ark., 2019). Yakın zamanda yapılan bir çalışma, MKH'lerin TNF-α (TNF-α ile prime edilmiş MKH) ile ön koşullandırılmasının, üretral fibrozis fare modelinde fibroblast aktivasyonunu ve inflamatuar yanıtları inhibe eden miR-146a içeren eksozomlar ürettiğini ve miR-146a'nın anti-inflamatuar etkileri gösterdiğini gösterdi (Liang ve ark., 2019). Ek olarak, TNF-α ile hazırlanmış MKH''lerden

gelen eksozomların, Wnt-3a'nın in vitro ekspresyonunu artırarak birincil insan osteoblastlarının çoğalmasını ve farklılaşmasını iyileştirdiği bulunmuştur (Lu ve ark., 2017). MKH'lerin IL-1β (IL-1β-primed MKH) ile in vitro ve in vivo ön koşullandırmanın etkileri de rapor edilmiştir. Song ve ark., IL-1β ile hazırlanmış MKH'lerin ve bu hücreler tarafından üretilen eksozomların bir fare sepsis modelinde terapötik etkilerini araştırdı ve hücrelerin bu modelin hayatta kalma oranını arttırdığını buldu. Ayrıca, IL-1β ile hazırlanmış MKH'ler, anti-inflamatuar miR-146a'nın yukarı doğru düzenlenmiş ifadesini gösterdi; bu hücrelerin eksozomları aynı zamanda makrofajlara aktarılan ve M2 polarizasyonunu indükleyen miR-146a'yı da içeriyordu (Song ve ark., 2017). Wang ve arkadaşları, MKH'lerin TGF-β (TGF-β ile prime edilmiş MKH) ile ön koşullandırılmasının, eksozomlarda miR-135b ekspresyonunu arttırdığını, bunun da bir osteoartrit sıçan modelinde Sp1 regülasyonu ve kıkırdak doku onarımı yoluyla in vitro kondrosit proliferasyonunu teşvik ettiğini gösterdi (Zhang v e ark., 2018).

MKH'lerinin ön koşullandırılması için proinflamatuar sitokinlerin bir kombinasyonunun kullanımını araştıran çeşitli çalışmalar vardır. IFN-γ ve TNF-α ile prime edilmiş MKH'lerden gelen EV'ler, saf MKH'lerden gelen ekstraselüler veziküllere kıyasla farklı protein, miRNA ve sitokin profilleri gösterdi. IFN-y ve TNF-α ile hazırlanmış MKH'lerden ekstraselüler vezikül ile lipopolisakkarit (LPS) ile indüklenen sıçan splenositlerinin kültürlenmesi, in vitro olarak splenositlerdeki pro-inflamatuar sitokinlerin (IFN-y, TNF-α) seviyelerini belirgin şekilde azaltır; artan prostaglandin E2 (PGE2) ve siklooksijenaz 2 seviyelerine bağlıdır (Harting vd., 2018). Başka bir çalışma, çeşitli immün baskılayıcı faktörlerin (IDO, PGE2, IL-8, IL-6, CCL-2) ekspresyonunun IFN-y- ve TNF-α ile hazırlanmış MKH'lerde arttığını gösterdi. Üstelik, hazırlanmış MKH'lerden gelen eksozomlar, makrofaj farklılaşmasını M2 fenotipine doğru çarpıtan potansiyel anti-inflamatuar faktörler olan miR-34a ve miR-146a düzeylerinde artış gösterdi (Domanis vd., 2018). Başka bir çalışma, IFN-y- ve TGF-β ile hazırlanmış MKH'lerden gelen eksozomların in vitro mononükleer hücrenin Treg'lere dönüşümünü teşvik ettiğini gösterdi (Zhang ve ark., 2018).

1.3.3.3. Hipoksili MKH'in Ön Koşullandırılması

Hipoksi koşullandırma, MKH'leri ve MKH'den türetilmiş eksozomları hazırlamak için yaygın olarak kullanılan bir yaklaşımdır. Çeşitli çalışmalar, hipoksi ile önceden koşullandırılmış MKH'lerden gelen eksozomların, normoksik koşullar altında kültürlenen

MKH'lerden gelen eksozomlara göre anjiyogenezi desteklediğini göstermiştir. 2012 yılında Zhang ve ark. hipoksi ile hazırlanmış insan göbek kordonu (GK) MKH'lerinden elde edilen mikropartiküllerin, in vitro GK-endotel hücresi (GK-EH) proliferasyonunu teşvik ettiğini ve ayrıca arka bacak iskemi sıçan modelinde kan akışı iyileşmesini iyileştirdiğini bildirmiştir (Zhang ve ark., 2012). Salomon ve ark. hipoksi ile hazırlanmış plasental MKH'lerden eksozomların etkilerini araştırdı. Bu eksozomlar göçü arttırdı ve plasental mikrovasküler endotel hücreleri tarafından tüp oluşumunu teşvik etti. Hipoksi ile hazırlanmış MKH'lerden gelen eksozomlar, in vitro insan göbek damarı endotel hücreleri (HUVEC) tarafından göçü ve kılcal ağ oluşumunu arttırdı. Ek olarak, hipoksi ile hazırlanmış MKH'lerden gelen eksozomlar, yağ grefti sonrası inflamasyonu hafifletti ve yağın hayatta kalmasını arttırdı (Han ve ark., 2018). Eksozomların bir yağ grefti ile birlikte transplantasyonu, EGF, fibroblast büyüme faktörü, anjiyopoietin-1 ve anjiyopoietin reseptörü (Tie-1) proteinlerinin ekspresyonunun artmasına neden olmuştur (Han ve ark., 2019). Hipoksi ile hazırlanmış MKH'lerden gelen eksozomların, normoksik koşullar altında kültürlenen MKH'lere kıyasla HUVEC'ler tarafından daha kolay alındığı gözlendi; alınan eksozomlar vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ekspresyonunu ve protein kinaz A sinyal yolu aktivasyonunu teşvik etti, bu da HUVEC'ler tarafından geliştirilmiş anjiyogenezle sonuçlandı (Almeria ve ark., 2019). Hipoksi ile hazırlanmış MKH'den gelen eksozomların da miyokardiyal onarımı teşvik ettiği gösterilmiştir. Bir çalışma, eksozomların miR-210'u nSMase2'ye bağımlı bir şekilde HUVEC'lere aktardığını, bunun da bir miyokardial enfarktüs fare modelinde HUVEC'lerin in vitro anjiyojenik ve anti-apoptotik fonksiyonlarında iyileşme ve kardiyokoruma (gelişmiş vaskülarizasyon ve hayatta kalma oranı) ile sonuçlandığını buldu (Zhu ve ark., 2018). Hipoksi ile hazırlanmış MKH'lerden gelen eksozomlar ayrıca miyokardial enfarktüs fare modelinde hücre ölümünü engelleyen miR-125b'yi içerir (Zhu ve ark., 2018); başka bir çalışma, eksozomların miRNA-26a aracılığıyla GSK3β ekspresyonunu doğrudan baskıladığını ve bunun da bir miyokardial enfarktüs sıçan modelinde kardiyoprotektif etkilere yol açtığını öne sürdü (Park vd., 2018).

Hipoksi ile hazırlanmış MKH'lerden gelen eksozomlar ayrıca yenilenmeyi teşvik edebilir, bağışıklık tepkilerini değiştirebilir ve nöroprotektif etkiler gösterebilir. Örneğin, yağdan türetilmiş, hipoksi ile hazırlanmış MKH'lerden elde edilen ortam, daha fazla sitokin (IL-6, TNF-α) ve büyüme faktörü (HGF, VEGF) içerir ve in vitro JAK/STAT3 sinyallemesi yoluyla normoksik duruma kıyasla AML12 hücre proliferasyonunu destekler (Lee vd., 2015). Ayrıca, hipoksi ile hazırlanmış MKH'lerden türetilen mikropartiküllerin, kısmen

PI3K/AKT ve HIF-1α yolu yoluyla hücre proliferasyonunu ve U2OS hücrelerinin in vitro göçünü teşvik ettiği bulunmuştur (Lin vd., 2019). Hipoksi ile hazırlanmış MKH'lerden gelen eksozomlar ayrıca immünomodülatör fonksiyonlara da sahiptir (Li vd., 2015). Endotoksin kaynaklı akut akciğer hasarı fare modelinde, hipoksi ile hazırlanmış MKH'lerden gelen eksozomlar, bronkoalveoler lavaj (BAL) sıvısındaki beyaz kan hücrelerinin ve nötrofillerin seviyesini azalttı. BAL'daki MIP-2 (CXCL2 olarak da bilinir) ve ozmotik protein seviyeleri de ölmüştür (Lee vd., 2016). Hipoksi ile hazırlanan MKH'lerin, antiinflamatuar eksozomların üretimi ile sonuçlanan ve M2 makrofaj polarizasyonu ve Treg indüksiyonu ile ilişkili olan glikolitik yeniden programlamadan geçtiği rapor edilmiştir (Showalter vd., 2019). Başka bir çalışma, M2 polarizasyonuna kısmen eksozomlarda bulunan miR-21-5p'nin aracılık ettiğini ileri sürdü (Ren vd., 2019). Son olarak, Alzheimer hastalığının bir APP/PS1 fare modelinde, hipoksi ile hazırlanmış MKH'lerden gelen eksozomlar, amiloid plak birikimini ve beta amiloid seviyesini azalttı ve büyümeyle ilişkili protein 43 ve sinapsin 1 gibi sinaptik proteinlerin ekspresyonunu yukarı doğru düzenledi (Cui vd., 2018). Hipoksi ile hazırlanmış MKH'lerden gelen eksozomlar, astrosit ve mikroglia aktivasyonunu inhibe etti ve mikroglia'nın dendritik hücrelere dönüşümünü destekleyerek in vivo nöroprotektif bir etkiye neden oldu. Ayrıca eksozomlar, pro-inflamatuar sitokinlerin (TNF-α, IL-1β) ekspresyonunu azalttı ve anti-inflamatuar sitokinlerin (IL-4, IL-10) ekspresyonunu arttırdı.

1.3.3.4. MKH'in Biyomoleküller veya Kimyasallarla Ön Şartlandırılması

Bazı çalışmalar, LPS ile önceden koşullandırılmış MKH'lerden gelen eksozomların etkilerini, koşullandırılmamış MKH'lerden gelen eksozomlarla karşılaştırmıştır. Bu tür MKH'lerin sekretomunun, in vivo serum IL-6 ve TNF-α seviyelerini azaltarak karaciğer rejenerasyonunu iyileştirdiği gösterilmiştir (Lee ve ark., 2015). Diğer çalışmalar, LPS ile hazırlanmış MKH'lerden gelen eksozomların, THP-1'i uyararak anti-inflamatuar sitokinlerin üretimini arttırdığını ve M2 polarizasyonunu teşvik ettiğini ortaya çıkardı (Ti ve ark., 2015). Monosit aktivasyonu ve farklılaşmasında rol oynayan miRNA let-7b, bu eksozomlarda özellikle yüksek seviyelerde mevcuttur. Yakın zamanda yapılan bir çalışma aynı zamanda LPS ile hazırlanmış MKH'lerden alınan eksozomlarla makrofajların kültürlenmesinin STAT3 gen ekspresyonunu, sitokinlerin salgılanmasını (IL-10 ve IL-15) ve büyüme faktörlerinin ekspresyonunu (FLT-3L) arttırdığını göstermiştir; bu tür makrofajlar ayrıca akut radyasyon sendromunun bir fare modelinde hayatta kalma süresini uzatır. Farklı bir çalışma, LPS ile hazırlanmış MKH'lerden gelen eksozomların, M2 makrofaj polarizasyonunu arttırdığını, bunun da bir fare miyokardial enfarktüs modelinde enfarktüs

sonrası inflamasyonun ve kardiyomiyosit apoptozunun zayıflamasıyla sonuçlandığını gösterdi.

Ön koşullandırma maddeleri olarak çeşitli başka moleküller test edilmiştir. Son çalışmalar trombinin etkilerini incelemiştir. Trombin (trombin ile hazırlanmış MKH'ler) ile önceden koşullandırılmış MKH'lerden alınan eksozomlar, in vitro HUVEC'ler tarafından proliferasyonu, migrasyonu ve tüp oluşumunu ve in vivo kutanöz yara iyileşmesini iyileştirmiştir (Kim ve ark., 2019). Başka bir çalışmada, Wharton's Jelly'den trombinle hazırlanmış MKH'lerden alınan eksozomlar, gelişmiş anti-inflamatuar ve anti-apoptotik etkiler gösterdi, bu da hipoksik iskemik ensefalopatili bir sıçan modelinde beyin enfarktüsünün zayıflamasıyla sonuçlandı. Melatonin ile önceden koşullandırılmış MKH'lerden alınan eksozomlar, renal iskemi-reperfüzyon hasarı olan bir sıçan modelinde HIF1a, ICAM1, IL1B ve NFkB ekspresyonunu azalttı ve BCL2, HO1, IL10 ve VEGF ekspresyonunu arttırdı (Alzahrani ve ark., 2019), oysa MKH'lerden eksozomlar ileri glikasyon son ürünleriyle önceden şartlandırılmış, yüksek düzeyde miR-146a içermiş ve vasküler düz kas hücrelerinin in vitro kalsifikasyonunu inhibe etmiştir (Wang ve ark., 2018). Bir çalışma, MKH'lerin deferoksamin ile ön koşullandırılmasının miR-126a ekspresyonunu arttırdığını bildirdi; bu hücrelerden türetilen eksozomlar, HUVEC'ler tarafından anjiyogenezi teşvik etti ve diyabetik bir sıçan modelinde kutanöz yara iyileşmesini destekledi (Ding ve ark., 2019). İlginç bir şekilde, MKH'leri Suxiao Jiuxin hapı (akut koroner sendromda kullanılan geleneksel bir Çin tıbbı) ile tedavi etmek, H3K27 demetilaz UTX'in ekspresyonunu azaltarak kardiyomiyositlerin çoğalmasını artıran türetilmiş eksozomların fonksiyonunu arttırdı. NO ile önceden koşullandırılmış MKH'lerden alınan eksozomlar, artan düzeyde VEGF ve miR-126 içeriyordu ve HUVEC'ler tarafından anjiyogenezi destekledi. NO donörü olarak sodyum nitroprussidin (SNP) kullanıldığı başka bir çalışmada, Jagged-1 ve VEGF-α mRNA'larla zenginleştirilmiş SNP ile hazırlanmış MKH mikropartiküllerinin, Jagged-1 ve VEGF-αmRNA'larını güçlendirerek hematopoietik kök hücrelerin transplantasyon etkinliğini arttırdığı bulunmuştur. VEGF-αifadesi (Jalnapurkar ve ark., 2019). Ek olarak, H_2O_2 ile önceden koşullandırılmış MKH'lerden alınan eksozomlar, HUVEC'lerin çoğalmasını ve göçünü arttırdı ve sıçan iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde deri flep iyileşmesini iyileştirdi.

1.3.3.5. MKH'den Türetilmiş Eksozomların İşlevini İyileştirmek İçin Gen Aşırı İfadesi

Çeşitli çalışmalar gen aşırı ekspresyonunun MKH'den türetilmiş eksozomlar üzerindeki etkilerini araştırmıştır. 2010 yılında bir çalışma, GATA-4'ü aşırı eksprese eden MKH'lerden gelen parakrin faktörlerinin, HUVEC'lerin anjiyojenik fonksiyonunu ve hayatta kalmasını arttırdığını bildirdi (Li ve ark., 2010). Daha sonra, bu tür MKH'lerden gelen eksozomların, bir MI fare modelinde kalp fonksiyonunu iyileştirdiği (kalp damarlarının sayısını arttırdığı ve apoptotik kalp hücrelerinin sayısını azalttığı) gösterilmiştir (He ve ark., 2018). Başka bir çalışmada, Akt'yi aşırı eksprese eden MKH'lerden türetilen eksozomların, akut MI sıçan modelinde in vitro anjiyojenik fonksiyonları teşvik ettiği ve trombosit türevli büyüme faktörü D'yi aktive ederek kardiyak rejenerasyonu iyileştirdiği bulunmuştur (Ma ve ark., 2017). IDO'nun, MKH'lerin immünomodülatör etkilerine aracılık ettiği bilinmektedir (Ling ve ark., 2014) ve IDO'yu aşırı eksprese eden sıçan MKH'lerinden türetilen eksozomların, kardiyak allograftlarda Treg sayısını arttırdığı, CD8+ T hücrelerinin sayısını ve proinflamatuar sitokin düzeylerini azalttığı ve immün toleransı arttırdığı bulunmuştur (He ve ark. ,2018).

MKH'lerde belirli genlerin aşırı ekspresyonunun, bu hücreler tarafından üretilen eksozomların nöro-koruyucu ve rejeneratif aktivitesini arttırdığı gözlemlenmiştir. 2013 yılında Xin ve ark. miR-133b'yi aşırı eksprese eden MKH'lerden türetilen eksozomların, orta serebral arter tıkanıklığına (MCAO) sahip bir sıçan modelinde iskemik sınır bölgesinde akson plastisitesini ve nörit yeniden yapılanmasını arttırdığını öne sürdü (Xin ve ark., 2013). Ayrıca, miR-25'i aşırı eksprese eden MKH'lerden gelen eksozomlar, geçici iskemi olan bir sıçan modelinde IL-1β ve TNF-α seviyelerini azalttı ve motor nöron sayısını arttırdı, bu da omuriliğin korunmasına yol açtı (Zhao vd., 2019).

Gen aşırı ekspresyonunun MKH'lerin anti-tümör etkileri üzerindeki sonuçları da araştırılmıştır. TRAIL eksprese eden MKH'lerden gelen eksozomlar, in vitro kanser hücrelerinde apoptozu indüklemiştir (Yuan ve ark., 2017). Farklı bir çalışma, miR-122'yi aşırı eksprese eden MKH'lerden türetilen eksozomların, hepatoselüler karsinomu kemoterapötik ajanlara (sorafenib) duyarlı hale getirerek sorafenib'in in vitro ve in vivo antitümör aktivitesini arttırdığını gösterdi (Lou ve ark., 2015). Başka bir çalışma, sorafenibe dirençli kanser hücrelerinde aşırı eksprese edilen GRP78'e karşı küçük bir müdahaleci RNA'yı aşırı eksprese eden MKH'lerden gelen eksozomların, HCC'yi in vitro ve in vivo olarak sorafenib'e yeniden duyarlı hale getirdiğini bildirdi (Li ve ark., 2018). MiR-119a'yı

aşırı eksprese eden MKH'lerden gelen eksozomlar, glioma hücrelerinin proliferatif, invaziv ve migratif aktivitelerini baskıladı, in vitro olarak ankirin tekrarını ve PH alanı 2'yi aşağı regüle ederek glioma ilerlemesinin baskılanmasıyla sonuçlandı (Yu ve ark., 2019). Başka bir çalışmada, prostat kanseri hücrelerinin göçü ve istilasının, yonca faktör 3'ün aşağı regülasyonu yoluyla miR-143'ü aşırı eksprese eden MKH'lerden gelen eksozomlar tarafından in vitro olarak inhibe edildiği gösterilmiştir (Che ve ark., 2019). Başka bir çalışmada, ağız kanseri hücrelerinin proliferatif, migratif ve invaziv aktiviteleri, kollajen tip X alfa 1 zincirinin hedeflenmesi yoluyla miR-101-3p'yi aşırı eksprese eden MKH'lerden gelen eksozomlar tarafından bastırıldı (Xie ve ark., 2019).

Gonzalez-King ve ark. HIF-1α'yı aşırı eksprese eden MKH'lerden gelen eksozomların, HUVEC'ler tarafından tüp oluşumunu iyileştirdiğini ve Jagged 1'e bağlı bir mekanizma aracılığıyla in vivo yeni damar oluşumunu tetiklediğini gösterdi (Gonzalez-King ve ark., 2017). Bazı çalışmalar genetiği değiştirilmiş MKH'lerden türetilen eksozomların kemik yenileyici bir fonksiyona sahip olduğunu bildirmiştir. MiR-140'ı aşırı eksprese eden MKH'lerden gelen eksozomlar, eklem kondrositlerinin in vitro proliferatif ve migratif aktivitelerini artırdı ve in vivo olarak osteoartritin semptomlarını hafifletti (Tao ve ark., 2017). Diğer araştırmalar, miR-92a-3p'yi aşırı eksprese eden MKH'lerden gelen eksozomların, in vitro kondrojenezi teşvik ettiğini ve bir OA fare modelinde WNT5A ekspresyonunu baskılayarak kıkırdak bozulmasını baskıladığını gösterdi (Mao ve ark., 2017). Son çalışmalar, miR-375'i aşırı eksprese eden MKH'lerden gelen eksozomların, insülin benzeri büyüme faktörü bağlayıcı protein 3'ün ekspresyonunu inhibe ederek in vitro osteojenik farklılaşmayı desteklediğini ve kalvaryal kusurlu sıçan modelinde kemik rejenerasyonunu iyileştirdiğini gösterdi (Chen ve ark., 2019).

1.4. Sitokin kompleksinin MKH-eksozomları üzerindeki etkileri

Daha önce de belirtildiği gibi, inflamatuar ortam, MKH'in immün düzenleyici kapasitesini modüle eder ve bu fenomen, klinik öncesi ve klinik çalışmalarda rapor edilmiştir (López-García ve ark., 2021). Bu hücreler, MKH'lerin immün düzenleyici özelliklerini uyaran inflamatuar bir ortamın varlığı nedeniyle, hastalığın orta aşamalarındaki hastalara uygulandığında daha büyük bir terapötik etki gösterir. Yüksek serum IFN-γ seviyeleri, lupus eritematozuslu hastalarda umblikal kord kanı-MKH'lerin terapötik başarısını öngörmek için olumlu bir prognostik belirteç olabilir (Wang ve ark., 2017). MKH'lerin uygulanmasının, steroidlere dirençli akut GVHD'li hastalarda hastalığın semptomlarını önemli ölçüde

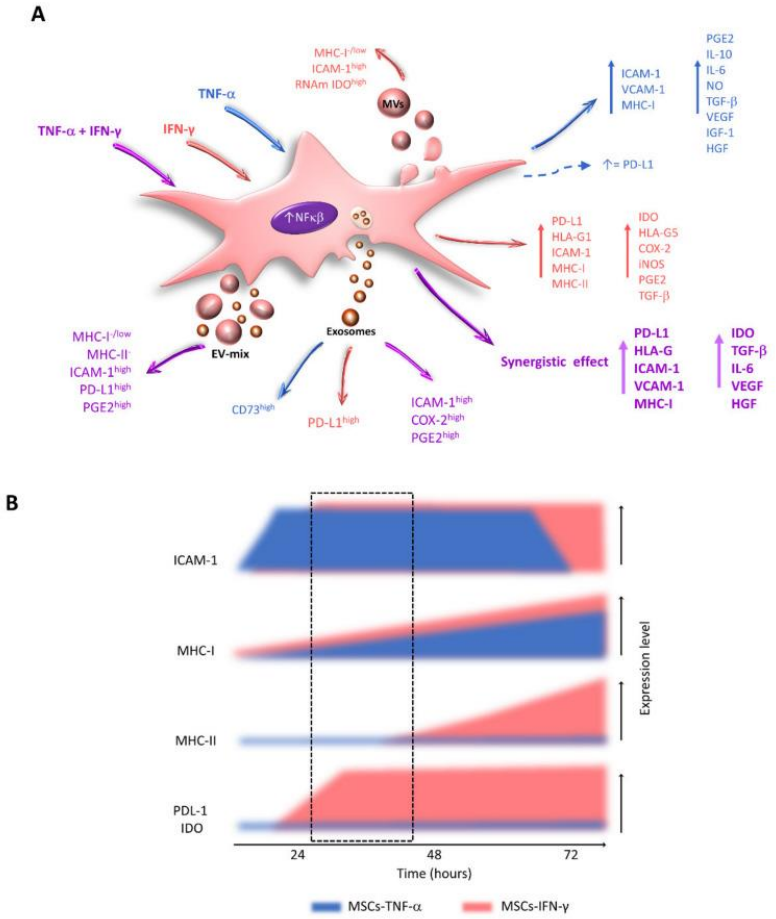
azalttığı GVHD tedavisinde de benzer gözlemler yapılmıştır (Castro-Manrreza ve ark., 2015). Ek olarak, AT-MKH'lerin romatoid artritli hastalardan alınan sinovyal sıvıya maruz bırakılmasının yakın zamanda COX-2, IDO, IL-6, TSG-6, ICAM-1, VCAM-1 ve PD-L1 mRNA'nın aşırı ekspresyonunu indüklediği gösterilmiştir; Antikorlar kullanılarak yazarlar, bu değişikliklerin esas olarak TNF-α'nın etkisiyle indüklendiğini belirlediler (Sayegh ve ark., 2019). Bu bulgulara dayanarak çok sayıda laboratuvar, bu hücrelerin immün düzenleyici potansiyelini ve dolayısıyla terapötik etkilerini geliştiren in vitro koşullandırma protokolleri oluşturmak için proinflamatuar sitokinlerin MKH'lerin farklı biyolojik özellikleri üzerindeki etkisini analiz etmeye odaklanmıştır.

TNF-α, otokrin, parakrin veya sistemik şekilde işlev gören pleiotropik bir sitokindir; esas olarak makrofajlar, dendritik ve lenfositler tarafından ifade edilir ve çok sayıda inflamatuar, immünomodülatör ve doku rejenerasyon yolunda rol oynar. Salgılanması veya aktivitesindeki değişiklikler, inflamatuar ve otoimmün hastalıklarla ilişkilidir (Kalliolias ve ark., 2016). Enflamatuar bir süreç sırasında, TNF-α, bağışıklık sistemi hücreleri tarafından salgılanan ilk sitokinlerden biridir ve hücrelerin diğer uyaranlara yanıt verme yeteneğini artırabilir (hazır) veya azaltabilir (duyarsızlaştırabilir veya tolere edebilir). Bununla birlikte, TNF-α'nın MKH'ler üzerindeki etkisine ilişkin çok az rapor bulunmaktadır. Bazı çalışmalar bu sitokinin bu hücrelerdeki immün düzenleyici moleküllerin ekspresyonunu değiştirmediğini göstermektedir. Buna karşılık, TNF-α'nın, aktive edilmiş T lenfositleri tarafından salınan ilk sitokin olduğundan, MKH'nin uyarılması için başlangıç uyarısını sağladığı öne sürülmüştür.

Kİ-MKH'lerin TNF-α ile tedavisi, IDO ekspresyonunu etkilemez ancak PGE2, IL-10, IL-6, NO ve ICAM-1 düzeylerini artırır (Nogueira-Pedro ve ark., 2020). Özellikle insan Kİ-MKH'lerinde TNF-α, 6 saatlik maruz kalma sonrasında ICAM-1 ekspresyonunu indükler ve 24 ve 48 saatte en yüksek seviyelere ulaşır (Montesinos vd., 2020); bu olay daha büyük bir göç kapasitesi ile ilişkilidir (Lu ve ark.., 2016). Benzer şekilde, 24 saatte, TNF-α ile tedavi VCAM-1, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), insülin benzeri büyüme faktörü 1 (IGF-1) ve HGF düzeylerini artırır. 48 saat sonra önemli ölçüde daha yüksek IL-6 seviyeleri tespit edilir. Ek olarak, sıçan umblikal kord kanı-MKH'lerinde TNF-α, TGF-β ve IL-10'un ekspresyonunu uyarır (Putra ve ark., 2018). Dolayısıyla TNF-α, MKH'lerin immün düzenleyici aktivitesini destekler ve hücre temasını içeren mekanizmaların önemi göz önüne alındığında, bu sitokinin adezyon moleküllerinin ekspresyonunu hemen arttırması önemlidir (Şekil 4).

IFN-γ, doğuştan gelen ve kazanılmış bağışıklık tepkilerinin uyarılmasında rol oynayan anahtar bir sitokindir. Esas olarak Th1 lenfositleri, CD8 ve NK hücreleri tarafından üretilir. Bu sitokin, MKH'ler de dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinin yüzeyindeki majör doku uyumluluk kompleksi moleküllerinin ekspresyonunu uyarır veya arttırır (Noone vd., 2015). Ayrıca IDO ve PD-L1 ekspresyonunu indükler ve PGE2 ve TGF-β sekresyonunun yanı sıra HLA-G1, HLA-G5, ICAM-1, COX-2 ve iNOS'un ekspresyonunu arttırır. Bu olaylar MKH'lerin daha büyük bir bağışıklık düzenleyici kapasitesine dönüşür. Çok sayıda rapor, önemli bir uyarı sağlarken MKH'lerin maruz kaldığı tek molekül olmayan IFN-y'nin etkilerini tanımlamıştır; bu da diğer sitokinlerin etkilerinin araştırılması gerektiğine işaret etmektedir (Şekil 1.18).

Dekstran sülfatın neden olduğu kolitin fare modelinde, IFN-y ile tedavi edilen Kİ-MKH'lerin uygulanması mukozal hasarı azalttı ve hayatta kalma oranlarını iyileştirdi. Bu etkiler, MKH'lerin Th1 hücrelerinin aracılık ettiği inflamatuar yanıtı inhibe etmede daha etkili olmaları nedeniyle artan göç ve immün düzenleyici kapasiteleriyle ilişkilendirilmiştir. Benzer şekilde, IFN-γ ile tedavi edilen insan Kİ-MKH'lerinin uygulanması, sisplatin ile akut böbrek hasarı olan bir fare modelinde tübüler hasarı azalttı ve böbrek fonksiyonunu iyileştirdi ve değişiklikler, aktive edilmiş MKH'ler tarafından artan IL-10 salgılanmasıyla ilişkilendirildi. Ek olarak, IFN-y ile aktive edilen insan Kİ-MKH'lerinin uygulanması, kalvaryal lezyonları olan farelerde kemik rejenerasyonunu destekler. Bu olumlu etkiler temel olarak, in vitro T lenfosit proliferasyonunu etkileyen insan Kİ-MKH'leritarafından IDO ekspresyonundaki artışa bağlıydı.



Şekil 1.18. TNF-a ve IFN-y'nin immün düzenleyici moleküllerin MKH'ler tarafından ekspresyonu üzerindeki etkisi. (A) TNF-α (mavi), IFN-γ (kırmızı) veya TNF-α ve IFN-γ (mor) ile uyarılan MKH'lerde gözlenen immün düzenleyici moleküllerin ekspresyonundaki değişiklikler gösterilir. Belirtilen sitokinlerle tedavi edilen MKH'ler tarafından salınan eksozom yükü, MV'ler ve EV karışımındaki değişiklikler de gösterilmiştir. (B) TNF-α ve IFN-y'nin, MKH'ler tarafından immün düzenleyici ve immünojenik moleküllerin ekspresyonu üzerindeki geçici etkisi. TNF-a ile 24 ila 48 saatlik tedavi arasında MKH'ler ICAM-1 ekspresyonunu artırır ancak MHC-I ve MHC-II'yi artırmaz. Eş zamanlı olarak IFN-y, ICAM-1, PD-L1 ve IDO'nun ekspresyonunu uyarır ancak MHC-II'yi uyarmaz. Bu olaylar, yüksek immün düzenleyici kapasiteye ve düşük immünojenik potansiyele sahip MKH'lerin elde edilebileceği bir pencere oluşturur (noktalı çizgi kutusu) (López-García ve ark., 2021).

Önemli bir proinflamatuar sitokin olan interlökin-1β (IL-1β), inflamatuar hastalıkların erken evresinde zenginleşir ve organ fonksiyon bozukluğunun şiddeti/gelişimi ile ilişkilidir. İnflamatuar hastalıklar için terapötik bir hedef olarak ortaya çıkmasına rağmen, artan kanıtlar IL-1β'nın varlığının MKH bazlı tedaviler için faydalı olduğunu göstermiştir. Örneğin, diğer sitokinlerle birleştirilen IL-1β, parakrin aktivitesini artırabilir ve MKH'lerin immünomodülatör etkilerini iyileştirebilir. Ek olarak IL-1β tek başına MKH'lerin yaralanma bölgelerine göçünü indükleyebilir.

Kombine sitokinlerin MKH'lerin biyolojisi üzerindeki etkisini analiz eden çok az çalışma vardır. Fizyolojik bağlamda bu hücrelerin aktivasyonu, MKH fenotipini ve fonksiyonunu belirleyecek olan dengenin farklı uyaranların varlığına yanıt olarak meydana gelmesi nedeniyle bunu yapmak anlamlı olacaktır. Bu bulguları destekleyen bazı çalışmalar, proinflamatuar sitokin karışımlarıyla tedavi edilen MKH'lerin daha büyük bir immün düzenleyici kapasiteye sahip olduğunu belirlemiştir (Dal Collo ve ark., 2020).

In vitro çalışmalar, TNF-α ve IFN-y'nin, ICAM-1, VCAM-1 ve IL-6'nın yanı sıra TGF-β, IL-6, VEGF, HGF, IDO, PD-L1 ve HLA-G dahil olmak üzere Kİ-MKH'lerde immün düzenleyici moleküllerin ekspresyonu üzerinde güçlü bir sinerjistik etki gösterdiğini göstermiştir. Umblikal kord-MKH'ler ile de benzer sonuçlar elde edilmiştir. Ek olarak, TNF-α ve IFN-y ile uyarılan BM-MKH'lerle gerçekleştirilen bir proteomik çalışması, IL-4, IL-10, IL-12, IL-15, PD-L1, IDO ve HLA-G'nin yanı sıra CCL5, CXCL9, CXCL10 ve CXCL11 kemokinleri daha yüksek ekspresyonunu rapor etti. Araştırmacılar, kombine tedavinin, her donöre özgü sitokin ve kemokin ekspresyonundaki varyasyonu ortadan kaldırdığını öne sürdüler (Jin ve ark., 2016). Bununla birlikte bugüne kadar hiçbir çalışma, TNF-α ve IFN-y'nin immün düzenleyici moleküllerin ekspresyonu üzerindeki sinerjistik etkisinin, tek başına IFN-y ile aktive edilen aynı hücrelerle karşılaştırıldığında MKH'lerin daha büyük bir immün düzenleyici kapasitesi anlamına gelip gelmediğini analiz etmemiştir. Bugüne kadar yalnızca bir çalışma, bu sitokin karışımıyla uyarılan insan Kİ-MKH sferoidlerinin, aynı sitokinle uyarılan MKH'lere göre makrofajlar tarafından TNF-α üretimini daha etkili bir şekilde azaltabildiğini bildirmiştir (Zimmermann ve ark., 2014). Diğer çalışmalar TNF-α ve IFN-y'nin MKH'ler üzerindeki etkisini analiz etmiştir. Ancak bu çalışmaların deneysel tasarımı nedeniyle sinerjistik bir etkinin varlığını doğrulamak mümkün değildir. Bu bağlamda, TA-MKH'lerin her iki sitokinle uyarılmasının, IDO, PGE2, IL-10, IL-6, IL-18, CCL-2, TSG-6 ve HLA-G5 gibi immün düzenleyici moleküllerin ekspresyonunu arttırdığı gözlemlenmiştir.

TNF-α ve IFN-y ile aktive edilen insan Kİ-MKH'lerinin, monositlerin IL-10 salgılayan CD206+ M2 immünsüpresif makrofajlara dönüşümünü indükleyen IDO ekspresyonunu arttırdığı belirlenmiştir; bu özellikler MKH'lerin T lenfosit proliferasyonu üzerindeki immün düzenleyici etkisine katkıda bulunur. Her iki sitokinle tedavi edilen Kİ-MKH'ler ve TA-MKH'ler aynı zamanda T lenfositlerin proliferasyonunu da doğrudan azaltır. Bugüne kadar yapılan az sayıda çalışma, immün düzenleyici moleküllerin ekspresyonu üzerinde TNF-α ve IFN-y tarafından indüklenen sinerjistik etkinin, bu hücrelerin immün düzenleyici aktivitesini

gerçekten arttırıp artırmadığının belirlenmesi ihtiyacını vurgulamaktadır; bu, koşullandırma protokollerinde TNF-α'nın kullanılmasının gerekliliğine işaret etmektedir.

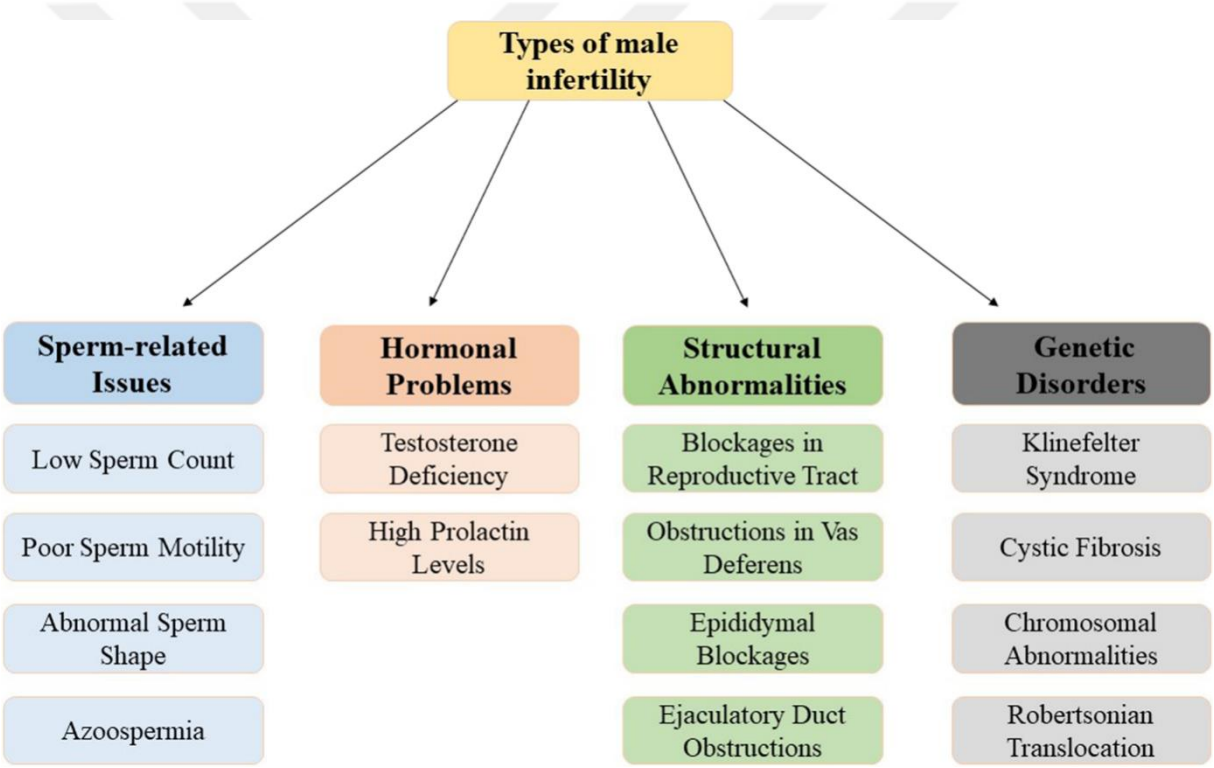
TNF-α, IL-1β ve NO'ya (ışınlanmış epitel hücreleri tarafından salınan sitokinler) maruz bırakılan sıçan Kİ-MKH'lerinden şartlandırılmış bir ortam, radyasyonun neden olduğu bağırsak hasarı olan sıçanlara uygulandı, bu da bağırsakta yapısal ve fonksiyonel hasarın azalmasına neden oldu ve hayatta kalma oranının artması. Bu inflamatuar ortama maruz kalan MKH'ler, apoptozu azaltma, bağırsak epitel hücrelerinin çoğalmasını uyarma ve bağırsak kök hücreleri oluşturma konusunda artan bir kapasite gösterdi. Ek olarak, IL-1β, IL-6 ve TNF-α seviyelerini azalttılar ve IL-10 salgılanmasını ve CD4+FoxP3+hücrelerinin farklılaşmasını arttırdılar; bunlar birlikte hayvanlarda lokal ve sistemik inflamatuar yanıtı azalttı (Chen ve ark., 2015). Benzer şekilde, adipoz doku-MKH'lerin akut GVHD'li hastaların plazmasına maruz bırakılması, bunların in vitro Treg farklılaşmasını indükleme yeteneklerini arttırmıştır (Silva-Carvalho ve ark., 2020). Bu sonuçlar, bu hücrelerin farklı patofizyolojik koşullar altında terapötik başarısını sağlayan in vitro koşullandırma stratejilerinin tasarımının önemini ortaya koymaktadır. Son zamanlarda, çeşitli çalışmalar IFN-γ'nın MKH'ler üzerindeki etkisini analiz etmeye odaklanmıştır; ancak son zamanlarda ilk uyarı olarak TNF-α'nın önemi vurgulanmıştır.

Öte yandan, diğer sitokin kombinasyonlarının etkisi yakın zamanda analiz edilmiş ve TNF-α ve IL-10'un Kİ-MKH'ler tarafından PGE2 salgılanması üzerinde sinerjistik bir etkisi gözlemlenmiştir (Saldaña ve ark., 2019). İnsan umblikal kord kanı-MKH'lerinde, IFN-y ve IL-1β'nın PGE2 ve IDO ekspresyonu üzerinde sinerjistik bir etkisi olduğu rapor edilmiştir; bu, bunların T lenfosit proliferasyonunu ve Th1 farklılaşmasını azaltma yeteneklerini arttırır; ayrıca Treg indüksiyonunda daha verimlidirler (Yu ve ark., 2019).

1.5. Erkek İnfertilite Türleri

Sperm anormalliklerini ifade eden çeşitli terimler vardır (Şekil 1.19) (Liakath ve ark., 2023). **Azospermi**, semen analizi orgazmdan sonra sperm sayımı göstermediğinde ortaya çıkar. Obstrüktif ve obstrüktif olmayan olmak üzere iki formu vardır. Obstrüktif azospermisi olan erkeklerde sperm üretilebilir ancak üreme kanalındaki tıkanıklık nedeniyle meniye giremez. Ancak obstrüktif olmayan azospermide testislerde sperm oluşumunda sorun vardır. Obstrüktif olmayan azospermi, erkek infertilitesinin en ciddi ve yaygın risk faktörü olarak kabul edilmektedir. **Oligozoospermi**, menideki sperm sayısının azalması anlamına gelen başka bir durumdur ve üç tipe ayrılmıştır: hafif (10 ila 20 milyon sperm/ml), orta (5 ila 10

milyon sperm/ml) ve şiddetli (daha az) 5 milyon sperm/ml). Bazı erkekler ayrıca boşalma ile birlikte meni eksikliği olarak tanımlanan aspermiden de muzdariptir. Retrograd ejakülasyon ve ejakülatuar kanal tıkanıklığının yanı sıra androjen eksikliği ve prostat kanseri de aspermiye katkıda bulunabilir. **Astenozoospermi** aynı zamanda sperm örneğinde sperm hareketliliğinin azalmasıyla ilişkili bir durumdur. Özellikle spermin kuyruk ve orta kısmındaki morfolojik kusurların ve metabolik eksikliklerin bir sonucu olabilir. **Nekrospermi**, tüm spermlerin ölü veya hareketsiz olduğu menideki diğer bir yaygın anormalliktir. **Teratozoospermi**, zayıf sperm gelişiminin bir sonucu olarak semende çok sayıda anormal şekilli spermin varlığı ile karakterize edilir. Ayrıca spermin baş, orta kısım veya kuyruk kısmında da morfolojik bozukluklar oluşabilmekte ve buna bağlı olarak çeşitli kısırlık sorunlarına yol açabilmektedir.



Şekil 1.19. Erkek infertilite tipleri (Liakath ve ark., 2023).

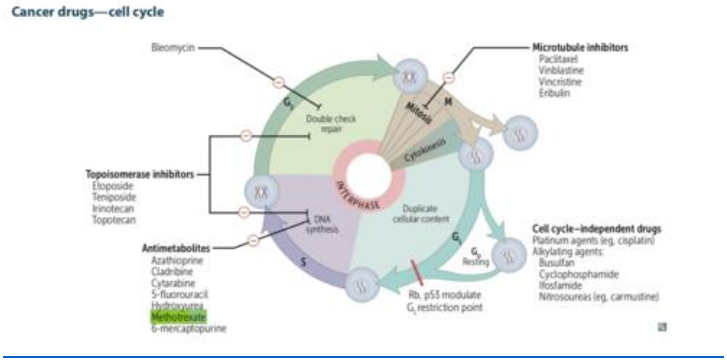
Toplamda, erkek infertilite vakalarının yaklaşık %90'ı düşük sperm konsantrasyonu ve/veya zayıf sperm fonksiyonu ile ilişkilidir. Hidrosel, varikosel, epididimoorşit, diyabet, anatomik problemler, seks hormonu dengesizliği, klamidyanın yanı sıra kalp-damar hastalıkları, kabakulak ve tüberküloz enfeksiyonları, tütün ve alkol tüketimi gibi çeşitli nedenlerle sperm konsantrasyonu azalabilmektedir. Ayrıca toksinlere, radyoterapiye ve ekstra ısıya maruz kalma, düşük kalitede sperm üretimine neden olabilir.

Ayrıca hipogonadizm, spermatogenezi etkileyebilecek seks hormonlarının üretiminin azalmasıyla testislerin bozulmuş fonksiyonuyla ilgili tıbbi bir terimdir [50]. Primer hipogonadizm (hipergonadotropik), testislerin yeterli miktarda testosteron üretemediği zamandır. İkincil hipogonadizm (hipogonadotropik), yetersiz gonadotropik salgılayan hormon ve/veya gonadotropin salgısının bir sonucudur.

Erkek infertilitesine yol açan diğer yaygın faktör ise azospermi faktörünün silinmesi, kistik fibroz, Klinefelter sendromu, Robertsonian translokasyonu ve Y kromozomundaki yapısal anormallikler gibi genetik kusurlardır.

1.5.1. Kemoterapi ajanlarının infertilite üzerindeki etkisi

Çocukluk çağı kanserlerine yönelik tedavi rejimlerinde devam eden ilerlemelere rağmen, sitotoksik kanser tedavisi ciddi bir gonadotoksik etkiye neden olmaktadır (Liakath ve ark., 2023). Yeni nesil kanser tedavi edici ajanların ortaya çıkmasıyla birlikte, çocukluk çağı kanserinde hayatta kalma oranları son birkaç on yılda %88'e varan bir artış gösterdi. Yalnızca Amerika Birleşik Devletleri'nde her yıl yaklaşık 10.000 çocuğun gonadotoksik kanser tedavisi gördüğü tahmin edilmektedir. Kanser tedavisinden sonra hayatta kalan çocuklar, kemoterapi ve radyoterapinin infertilite de dahil olmak üzere ciddi yan etkilerinden muzdariptir. On yılı aşkın süredir çocukluk çağında kanserden kurtulan 214 kişiyi takip eden bir çalışmada hastaların %25'inde azospermi, %28'inde oligospermi gözlendiği bulunmuştur. Sitotoksik kemoterapötik ajanlar, testisin germ hücreleri de dahil olmak üzere mitotik olarak aktif olan hücreler üzerinde zararlı bir etkiye sahiptir, spermiyogenez ve apoptoz süreçleri arasındaki sıkı bir şekilde düzenlenen dengeyi bozarak gonadotoksisiteye neden olur. Kemoterapiyi takiben görülen yaygın yan etkiler arasında geçici veya kalıcı erkek infertilitesine yol açan oligospermi ve azospermi bulunmaktadır. Siklofosfamid (CP) ve Busulfan (BF), multipl miyelom, sarkomlar, kronik miyeloid lösemi ve lenfomalar dahil olmak üzere çocukluk çağı kanserlerinin tedavisinde kullanılan en yaygın alkilleyici ajanlardır. Kanserden kurtulanlarda erkek infertilitesi yalnızca biyolojik çocuk sahibi olamamayı etkilemekle kalmaz, aynı zamanda duygusal sağlıklarını, özsaygılarını, ilişkilerini, sosyal imajlarını, mali durumlarını ve genel refahlarını da etkileyebilir. Bu nedenle pediatrik kanser hastaları ve ebeveynleri tedaviye başlamadan önce standart doğurganlık koruma seçenekleri konusunda bilgilendirilmelidir.



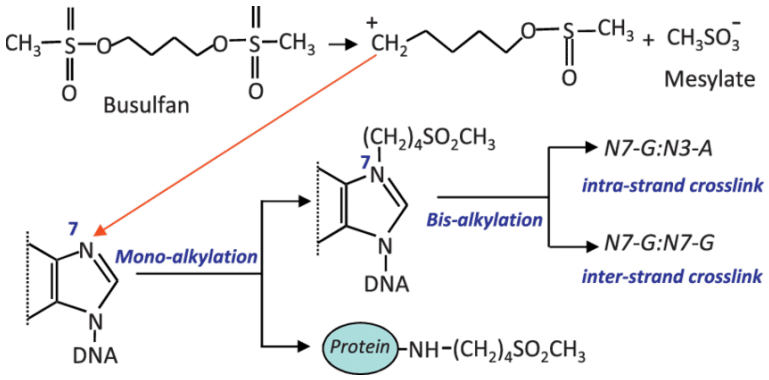
Şekil 1.20. Busulfanın hücre döngüsüne etkisi (https://hra.animalia-life.club/chemotherapy-drugs-and-cell-cycle).

Ergenlerde ve yetişkinlerde doğurganlığın korunmasına yönelik klinik olarak onaylanmış mevcut seçenek, spermin dondurularak saklanmasıdır. Ancak prepubertal erkek çocuklarda spermatogenez henüz başlamadığından spermin korunması uygulanamaz. Prepubertal erkek çocuklar için mevcut olan tek doğurganlık koruma seçeneği, testis dokusu biyopsisi ve ardından in vitro spermatogenez veya kriyoprezerve edilmiş dokuların transplantasyonu yoluyla olgun sperm üretmek için ihtiyaç duyulduğunda bu dokuların elde edilmesi umuduyla kriyoprezervasyondur. Bununla birlikte, fare modellerinde yapılan çalışmalar, spermatogonial kök hücreleri (SKH) barındıran testis dokusunun transplantasyonunun daha az hedef bulma etkinliğine sahip olduğunu göstermiştir. SKH nakli sonrası epigenetik yeniden programlamadaki eksiklik, hasarlı destekleyici mikro çevreye atfedilebilir. Gonadotoksik kemoterapi ve radyasyon sadece SKH'lere değil aynı zamanda Leydig, Sertoli ve peritübüler hücreler gibi niş hücrelere de zarar verir. Sperm ve testis dokusunun kriyoprezervasyonu mümkün olmadığında, in vitro spermatogenez için kullanılmak üzere deri biyopsilerinden veya kandan türetilen indüklenmiş pluripotent kök hücrelerin (iPSC'ler) üretimi gibi diğer yeni nesil teknolojiler geliştirilmektedir. Hem kriyoprezervasyon hem de iPSC seçenekleri hala deney aşamasındadır ve gonadotoksik kemoterapi gören prepubertal erkek çocuklarda SKH nişini ve doğurganlığını korumaya yönelik karşılanmamış büyük bir ihtiyaç vardır.

1.5.2. Busulfan'ın spermatojenik hücrelere karşı toksisite mekanizması

Kemoterapi ilaçları spermatogenezde yer alan hücrelerin üretimi ve apoptozu arasındaki dengeyi bozarak hasarlı spermatogeneze sebep olabilir (Puyo ve ark., 2014). Oligospermi ve azospermi kemoterapiyi takiben sık görülen yan etkilerdir ve geçici veya kalıcı erkek kısırlığına neden olabilir. Busulfan (1,4-bütandiol dimetansülfonat), kronik miyeloid lösemi, lenfomalar ve miyeloproliferatif bozuklukların tedavisinde en yaygın kullanılan kemoterapi

ve DNA alkilleyici ajanlarından biridir. Bu ilacın erkek ve dişi gonadlar üzerinde istenmeyen etkilere neden olduğu, spermatogenezi ve dolayısıyla normal sperm üretimini etkilediği bilinmektedir.



Şekil 1.21. Busulfan ve DNA veya protein alkilasyonu mekanizmasının yapısı (Chen ve ark., 2018)

Busulfan DNA yapısını yok eder, SSC'lerin çoğalmasını ve farklılaşmasını engeller ve apoptozu başlatır (Chen ve ark., 2018). Busulfan iki sülfonatlı metan fonksiyonel grubu içerir ve hücrelerde G0/G1 fazında etki eder. Prensip olarak, bimoleküler nükleofilik ikame yoluyla busulfan, guaninin N7 ve O6'sındaki ve adeninin N3'ündeki DNA'yı alkile edebilir ve 5'-GA-3' ve daha az ölçüde 5'-GG-3"te zincir içi çapraz bağlantılar oluşturabilir. Sonuç olarak, DNA çapraz bağlanmasının, DNA-protein çapraz bağlanmasının ve tek iplik kopmalarının ortaya çıkması, DNA replikasyonu ve transkripsiyonunun bloke edilmesi ve hücre proliferasyonu/farklılaşmasının inhibisyonu ile sonuçlanır.

Busulfan kaynaklı DNA hasarına yanıt olarak p53 ekspresyonunun arttığı ve apoptoza neden olduğu gösterilmiştir (Furukawa ve ark., 2007). Çekirdekte p53, BAX aktivasyonunu ve mitokondri ile etkileşimini teşvik eden adaptör proteini ASK'yı (S-faz kinaz aktivatörü) yukarı doğru düzenler ve apoptoz hedef genlerinin (Bax, Bid ve PUMA) ekspresyonu indüklenir. Bu genler aynı zamanda mitokondriyal membranda da bulunur ve geçirgenliğin artmasına, sitokrom C salınımına ve apoptozun indüklenmesine neden olur. İlginç bir şekilde, busulfan kaynaklı DNA hasarı, sitoplazmada p53'ün varlığıyla tespit edildiğinde, Bax-Bcl-xl ve Bax-Bcl-2 heterodimerleri, apoptozu indüklemek için Bax'i serbest bırakmak (veya doğrudan Bak'ı aktive etmek) üzere depolimerize olur. Bax/Bak heterodimeri, hücre içi apoptotik yolda bir kontrol noktasıdır. Spermatojenik hücrelerde busulfan tarafından indüklenen Fas, spesifik olarak sertoli hücrelerinin Fas ligandına (FasL) ve yeni ölüm alanı proteini FADD'ye (ölüm alanı olan Fas ile ilişkili protein) bağlanır. Bu, kaspaz-8'i aktive eden ölüme neden olan sinyal kompleksini oluşturmak için prokaspaz-8 ile birleşir. Kaspaz

3 ve kaspaz-7 daha sonra aktive edilir, DNA onarım enzimi PARP (poli (ADP-riboz) polimeraz) parçalanır ve Ca2+/Mg2+'ya bağlı endonükleaz aktivitesi artar; bu DNA bölünmesine ve hücre apoptozuna neden olur. Apoptotik indüksiyon faktörü Bid/Bax da aktive edilebilir ve hücre içi apoptoz yolunu başlatmak için mitokondriyal sitokrom C salınımını teşvik edebilir.

Busulfan, vimentin filamentlerini ve hücreler arası hücre yapışma molekülü-1'i (ICAM-1) yok eder. Vimentin filamentleri, sertoli hücreleri ile spermatojenik hücreler arasındaki sıkı bağlantıları koruyarak, sertoli hücrelerinin germ hücrelerini zamanında düzenlemesini sağlar. Yetişkin sıçanlarda busulfan ile sürekli tedavi üzerine, sertoli hücrelerindeki apikal VF'ler yavaş yavaş çekirdeğe doğru çökerek sertoli hücrelerinin bazal bölgesinde düzensiz hale gelir. Busulfanın etkisi geçtikten sonra spermatogenez yeniden düzenlenmeye başlar ve spermatogonia ve spermatositler arasında sertoli hücrelerinin bazal ve perinükleer bölgelerinde vimentin filamentler yeniden organize olur. ICAM-1 çeşitli hücre tipleri (örneğin: sertoli hücreleri ve germ hücreleri) tarafından eksprese edilir ve preleptoten/leptoten spermatositlerin kan-testis bariyeri (KTB) boyunca hareketini ve uzun spermatidlerin tübül lümenine salınmasını düzenler. Fareye busulfanın i.p. enjeksiyonu sonrasında testiküler ICAM-1'in hem mRNA hem de protein seviyelerinde önemli ölçüde azaldığı ve daha sonra yavaş yavaş düzeldiği görüldü. KTB, SKH'ler ve sertoli hücreleri arasındaki bağlantıyı etkileyen ICAM-1 ifadesindeki azalma nedeniyle hasar görür. Bununla birlikte, sertoli hücrelerindeki düzensiz VF dağılımı, SKH'ler ve sertoli hücreleri arasındaki yakın bağlantıyı ayırarak hücresel morfolojiyi yok edebilir, bu da niş mikro ortamın ve SKH'lerin stabilitesini etkiler. Özellikle SKH'lerin, spermatojenik hücrelerin ve sertoli hücrelerinin hasarının ve kaybolmasının eşzamanlı olarak gerçekleştiğini ve sertoli hücrelerinin SKH'lerle birlikte iyileştiğini bulduk (Qin ve ark., 2016). VF'lerin ve ICAM-1'in, SKH'lerin ve sertoli hücrelerinin bozulmasında ve geri kazanılmasında önemli bir düzenleyici rol oynadığını tahmin edilmektedir.

Busulfan farklılaşma faktörlerini bozar ve SKH'lerin farklılaşmasını engeller. Hamile sıçanların tek bir oral dozda busulfanla beslenmesi, embriyonik apikal ektodermal çıkıntıda ve ön mezenkim hücrelerinde kemik morfogenetik protein 4'ün (BMP4) ekspresyonunun azalmasına neden oldu. BMP4, örneğin ventral marjinal bölgede erken embriyonik gelişimde bulunan kemik morfogenetik protein ailesinin bir üyesidir. Bu, apikal ektodermal çıkıntıda ve mezenkim hücrelerinde hücre ölümünü arttırdı (Otsuji ve ark., 2005) ve embriyonun arka uzuvlarının yaklaşık %80'inde polidaktili ve sindaktili gibi

malformasyonlar sergilendi. Bu nedenle, busulfanın BMP4 ekspresyonunu azaltmasının hücre proliferasyonunu azalttığını ve bunun embriyo hipoplazisine yol açtığı öngörülmektedir. Farelere busulfan enjeksiyonundan bir hafta sonrasında c-kit ekspresyonu tespit edilemez hale geldi. Özellikle, c-kit ekspresyonundaki bu azalma, TUNEL (terminal deoksinükleotidil transferaz dUTP nick uç etiketlemesi) pozitif hücrelerde p53/Bax/Bcl-2'deki artıştan daha erken meydana geldi ve çoğu spermatogonia ve bazı spermatositlerde apoptozla sonuçlandı. Tedaviden iki ila üç hafta sonra mayotik spermatositlerde apoptozda hücreye özgü belirgin bir artış gözlendi. 4. haftada, busulfan ile tedavi edilen farelerin testislerinde, bazı farklılaşmamış spermatogonial kök hücreler haricinde, farklılaşan germ hücrelerinin tamamen kaybolduğu görüldü. Ancak c-kit ekspresyonu tespit edildi ve 5 hafta içinde kontrol seviyelerine geri getirildi. Benzer şekilde kök hücre faktörü mRNA düzeyleri ve farklılaşmış spermatogenik hücreler altıncı haftada tekrar tespit edildi. Bu sonuçlar, c-kit/SCF yolunun erkek germ hücresinin hayatta kalması için kritik olduğunu ve busulfan tedavisinin, c-kit'in aşağı regülasyonu nedeniyle kalıcı yerine geçici kısırlıkla sonuçlandığını göstermektedir (Choi vd., 2004). C-kit mutasyonu olan farelerde sadece birkaç mikro spermatojenik hücre tespit edilebilmekte ve spermatogenez engellenmektedir. BMP4, busulfan tarafından aşağı regüle edilebilir ve BMP4/Bmpr1a/Smads/Sohlh2/c-kit yolu yoluyla SKH farklılaşma işaretleyici genlerinin ekspresyonunu inhibe edebilir, böylece spermatogonia'nın spermatositlere farklılaşmasını engelleyebilir.

Busulfan, glial hücre soyundan türetilen nörotrofik faktör (GDNF) ve retinoblastoma (RB) fosforilasyonunun ekspresyonunu düzenleyerek SSC'lerin koruyucu proliferasyonunu ve dinlenmesini destekler. İ.p. busulfan enjeksiyonundan 5 gün sonra, seminifer tübüllerdeki GDNF mRNA düzeyleri en yüksek düzeye çıktığı, daha sonra yavaş yavaş azaldığı; 4 hafta sonra tedavi öncesi düzeye göre anlamlı bir fark saptanmadığı rapor edilmiştir (Zohni ve ark., 2012). Busulfan dozundan bağımsız olarak, SKH'lerin %95'inden fazlası 3 gün içinde kaybedilmiş ve doğurganlık tedaviden sonraki 4 hafta içinde kaybedilmiştir. Doğurganlık ve SKH sayıları kademeli olarak düzelmiş ancak daha yüksek busulfan dozlarında iyileşmenin daha yavaş olduğu gözlenmiştir. Testiküler GDNF'nin maksimum seviyesi yaklaşık 3 hafta sürse de farelerde sürekli enjeksiyondan sonra benzer sonuçlar elde edildi (Luo ve ark., 2010). Busulfanın kısa süreliğine koruyucu etkiler gösterdiği ve GDNF'nin yüksek sertoli hücre salgısını ve SKH'lerde hem Akt hem de Src ailesi kinaz sinyalini düzenleyerek proliferasyonu destekleyebildiği, farklılaşmayı engelleyebildiği ve spermatogenezi düzenleyebildiği tahmin edilmektedir (Wu ve ark.,

2011). Busulfan ile tedavi edilen fare testisleri, güçlü pRB (öncelikle dinlenme SKH'lerinde bulunan Rb'nin hipofosforile formu) ve zayıf çoğalan hücre nükleer antijeni (PCNA) sinyalleri sergilerken, kontrol yetişkin testisleri güçlü ppRB (çoğalan hücrelerde bulunan hiperfosforile edilmiş form) ve PCNA sinyalleri sergiler. PCNA, doğum sonrası 5. günde testiste çok güçlü bir şekilde eksprese edilirken, pRB ve ppRB eşit seviyelerde eksprese edilir (Choi ve ark., 2004). Busulfan tedavisi, siklin E'nin inhibisyonu yoluyla testiste Rb fosforilasyonunu inhibe edebilir; Daha sonra pRB, kompleks formda aktif olmayan, PCNA gen sentezini inhibe eden ve SKH'nin G0'dan G1 fazına geçişini engelleyen E2F'ye bağlı kalır. Aynı zamanda siklin E'nin ekspresyonu giderek azalır ve 4 hafta sonra giderek düzelir (Choi ve ark., 2004). Bu, busulfanın, siklin E'nin aktivitesini bozarak SKH dinlenmesine neden olacak şekilde pRB fosforilasyonunu inhibe edebileceğini gösterir.

Redoks dengesi busulfan tarafından bozulur ve bu da bir dizi spermatojenik hücrede oksidatif hasara neden olur. Redoks dengesi normalde hücrelerde oluşur. Hem in vivo beslenme hem de karaciğer hücrelerinin in vitro kültürlenmesi, busulfanın glutatyon ile konjuge olduğunu gösterdi. Serbest glutatyonun %50-60 azaldığı, glutatyonun hızla tükendiği ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) arttığı, oksidatif strese ve karaciğer hücre hasarına yol açtığı belgelenmiştir. Ancak busulfan tedavisinden sonra nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz inhibitörlerinin eklenmesiyle ROS azalmıştır. Busulfanın NADPH aracılığıyla ROS üretimindeki sürekli artışı tetiklediği ve NADPH oksidaz inhibitörünün bu oksidatif stresi etkili bir şekilde hafifletebildiği ileri sürülmüştür. Pek çok çalışma busulfanla tedavi edilen testislerin 1. ve 2. haftalarda anlamlı düzeyde artmış lipit peroksidasyon seviyeleri içerdiğini göstermiştir. Hücre zarı akışkanlığı ve geçirgenliği, ROS'un indüklediği malondialdehit (MDA) üretiminin gösterdiği gibi, busulfan tedavisiyle değiştirildi ve bu da hücre yapısı ve fonksiyonunda hasara yol açtı. Busulfanın tek bir i.p. enjeksiyonundan 45 gün sonra, farelerin germ hücrelerinde önemli dejeneratif değişiklikler görülmüş ve spermatogenez kaybı gözlenmiştir. Buna karşılık, melatonin enjeksiyonu ve ardından busulfan tedavisi alan farelerde spermatogenezde iyileşme görülmüştür (Mirhoseini ve ark., 2014). İlgili mekanizma üzerine yapılan araştırmalar, melatoninin, yüksek konsantrasyonlarda busulfan kaynaklı ROS'un neden olduğu busulfan kaynaklı SKH apoptozunu başarıyla iyileştiren manganez süperoksit dismutaz (MnSOD) ekspresyonunu arttırdığını göstermiştir (Li ve ark., 2017). Ek olarak resveratrol, busulfanın indüklediği azospermi fare modelinde SKH proliferasyonunu teşvik etmek ve SKH kaybını durdurmak için terapötik müdahaleye yönelik bir yaklaşım olabilir.

Antioksidanlar, yüksek konsantrasyonlarda ROS'un neden olduğu busulfan-indüklü SKH apoptozunu başarılı bir şekilde iyileştirebilir ve üreme hücresi proliferasyonunu indükleyebilir.

1.6. Erkek İnfertilitesime Bağlı Hastalıklarda Eksozom Bazlı Tedavi Yöntemleri

Dünya çapında en az altı çiftten biri infertiliteye sahiptir, yani %20-30'u erkek infertilitesinden, %25-40'ı ise her iki cinsiyetin infertilitesinden kaynaklanmaktadır (Jahanbani ve ark., 2023). Erkek infertilitesi, gametojenik hücrelerin hasar görmesi, sperm kalitesinin azalması ve erkek üreme sisteminin tıkanması gibi farklı mekanizmalara bağlı olarak ortaya çıkabilir. Erkeklerde infertilite sorunlarının yaklaşık %90'ı düşük sperm sayısı ve düşük sperm kalitesi gibi spermle ilgili bozukluklardan kaynaklanmaktadır. Seminal proteinler sperm olgunlaşması, kapasitasyon, akrozomal reaksiyon ve fertilizasyon için anahtar faktörlerdir ve diğer taraftan seminal eksozomlar tüm seminal plazma proteinlerinin toplamının %3'ünü taşır. Sonuç olarak Seminal eksozomlar ve bunların anneksin II gibi protein içerikleri, spermlerin kalitesini ve döllenme kapasitesini güçlü bir şekilde etkiler. Son yıllarda erkek doğurganlığının tedavisinde rejeneratif tıp yöntemlerinin özellikle sperm kalitesinin düşük olduğu durumlarda kullanılması oldukça ilgi görmektedir. Bu yöntemler hücre bazlı (MKH tedavisi gibi) veya hücre içermeyen (eksozom tedavisi gibi) tedavilere dayanır. Artan kanıtlar, MKH'lerin ve bunların salgılarının, anti-sperm antikorlarının (ASA) baskılanması, oksidatif stresin azaltılması, testosteron üretiminin uyarılması, hasar görmüş hücrelerin işlevinin düzenlenmesi, Akt/glikojen sentaz kinaz 3'ün (GSK3 (sperm motilitesini düzenleyen protein kinaz)) onarılması, spermatogenezle ilişkili bazı miRNA'ların ekspresyonunun ayarlanması, iyileştirilmesi ve hedef genlerinin değiştirilmesi yoluyla testis fonksiyonunun restorasyonunda işbirliği yapabileceğini kanıtlamıştır. Erkek infertilitesine bağlı hastalıkların tedavisinde yeni bir terapötik yöntem olarak eksozomların kullanılması, klinik uygulamalardaki MKH tedavilerinin zorluklarına çözüm olabilir gibi görünüyor. Son zamanlarda, spermatogenezi ve sperm rejenerasyonunu yeniden sağlamak için invaziv olmayan potansiyel yeni bir yaklaşım olarak eksozom bazlı stratejiler kullanılmıştır. Geçen yıl yapılan çalışmada, amniyotik sıvı kaynaklı eksozomların azospermili sıçan modelindeki terapötik etkileri, amniyotik sıvı kaynaklı eksozom enjeksiyonundan sonra hem spermatogenez indeksi hem de sperm parametrelerinde önemli ölçüde iyileşme olduğunu göstermiştir. Son yıllarda sperm kriyoprezervasyonu, sperm bankacılığı olarak adlandırılmakta ve araştırmacılar tarafından oldukça kabul gören etkili bir doğurganlık koruma prosedürü olarak adlandırılmaktadır. Donma-çözülme işlemi sırasında girilen kriyo-

stres nedeniyle sperm kriyo yaralanmaları ve spermatozoanın yok edilmesi bu teknolojinin karşılaştığı en önemli zorluktur. Eksozomların sperm kriyoyaralanmalarına karşı koruyucu etkisi çeşitli çalışmalarla desteklenmiştir. MKHden türetilmiş eksozomlar tedavi edilen spermatozoaları dondurup çözdürdükten sonra daha iyi sperm parametrelerine sahip olmanın yanı sıra, CD44, CD29, CD54 ve CD106 gibi adezyon moleküllerinin yer değiştirmesi yoluyla yapışkan ve füzojenik özellikleri de daha iyidir. MKH'den türetilmiş eksozomlar, erkek infertilitesine bağlı hastalıkların tedavisinde büyük terapötik potansiyel göstermiştir ve eksozomların terapötik amaçlar için ilaçlar veya biyoaktif moleküller ile yüklendiğini gösteren çeşitli klinik çalışmalar vardır.

Aynı zamanda, erkek doğurganlığıyla ilgili hastalıkların teşhisinde biyobelirteç olarak eksozomların ve içeriklerinin araştırılması da umut verici ilk sonuçlar sağlamıştır. Birçok araştırma, eksozomal anneksin II proteinleri gibi eksozomla ilgili proteinlerin erkek doğurganlığında çok önemli olduğunu ve erkek doğurganlık bozukluklarının biyobelirteçleri olarak tanıtılma potansiyeline sahip olduğunu göstermektedir. Normalden azospermik hastalara kadar prostaglandin D2 Sentaz (PTGDS) (enzim kodlayan gen) konsantrasyonunun düşme eğiliminde olduğunu ve vazektomi hastalarında kabaca sıfıra ulaştığı bulunmuştur. Çalışmalarının devamında vurgulanan bu grup, PTGDS'nin obstrüktif azospermi hastalarının tanısında biyobelirteç olarak kullanılabileceğini gösterdi. Obstrüktif azospermi hastalarında PTGDS düzeyleri, obstrüktif olmayan azospermi olan erkeklerle karşılaştırıldığında anlamlı derecede düşüktü. Üreme sistemi bozukluklarının patofizyolojisinde eksozomların önemine ilişkin alanda incelemeler ve çalışmalar hızla ilerlemekte ve değerli bilgiler bildirilmektedir, ancak daha ileri çalışmalara hala ihtiyaç vardır. Tüm ilerlemelere rağmen eksozomların biyobelirteç olarak kullanımı henüz Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanmamıştır.

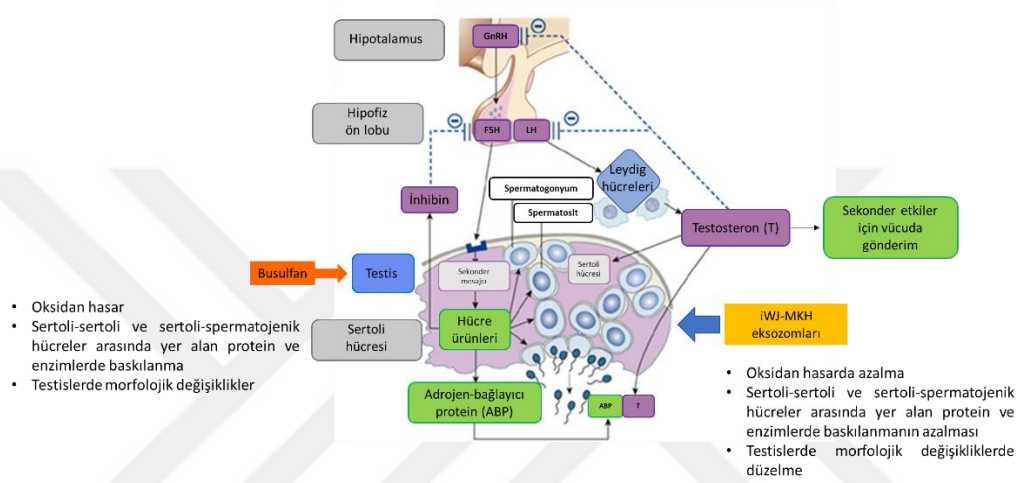
1.7. MKH'den Türetilen Eksozom Tedavilerinin Gelecekteki Yönleri

MKH'den türetilen eksozom tedavisi, özellikle inflamatuar bileşene sahip olanlar olmak üzere çeşitli hastalıkların tedavisi için umut verici bir strateji olarak ortaya çıkmaktadır (Mendt ve ark., 2019). Genetik materyali taşıma, hücre dışı bozulmadan koruma ve alıcı hücrelere son derece seçici bir şekilde iletme konusundaki doğuştan gelen yetenekleri, MKH'den türetilen eksozomların, kanser ve potansiyel olarak rejeneratif tıp için gen tedavilerinin yanı sıra küçük moleküller için ideal bir dağıtım sistemi olduğunu göstermektedir (Keshtkar ve ark., 2018). Ek olarak, cesaret verici klinik öncesi veriler,

MKH'den türetilen eksozom terapötiklerinin, güvenlik ve çok yönlülük açısından hücre bazlı tedaviye üstün olabileceğini gösterdi. Bununla birlikte, klinik kullanımlarını optimize etmek için kritik teknolojik hususların ve olası yan etkilerin belirlenmesinin ele alınması gerekmektedir (Gimona ve ark., 2017). Ayrıca, biyomühendislik ve hücresel modifikasyon tekniklerinin hızlı ilerlemesiyle birlikte, eksozom alanındaki bir sonraki adım, eksozom yüzeyinin ve içeriğinin mühendisliği veya modifikasyonu olacaktır; bu, üstün özgüllüğe izin verebilir ve kullanımlarını tıbbın daha karmaşık alanlarına genişletebilir.

2. AMAÇ

Literatürden edindiğimiz bilgiler doğrultusunda bizim bu çalışmada hipotezimiz; **kemoterapik bir ajan olan busulfan maruziyetinin erkek sıçanlarda infertiliteden sorumlu olabilecek değişikliklere yol açması ve uyarılmış iWJ-MKH eksozomlarının bu değişiklikleri hafifleterek fertiliteyi artırıcı etki göstermesidir.**



Günümüzde erkek infertilitesinin kesin bir tedavisi olmayıp, kemoterapiye maruz kalan erişkin ve ergenlik öncesi hastaların kalıcı azospermiye yakalanma riskleri çok fazladır ve azospermi sonucunda uygulamalar yetersiz kalmaktadır. Malign ve malign olmayan bozukluklar için yüksek doz kemoterapi ve radyasyonla tedavi edilen erkeklerde fertiliteyi korumak için çeşitli yöntemler hala araştırılmaktadır. Busulfan, kronik miyeloid lösemi, lenfomalar ve miyeloproliferatif bozuklukların tedavisinde en yaygın kullanılan alkilleyici bir kemoterapötik ajandır. Busulfan'ın erkek üreme sistemi üzerindeki etki mekanizması tam bilinmese de sonuçta testislerde endojen spermatojenik hücrelerin tükenmesi üzerinden infertiliteye neden olduğu birçok araştırmacı tarafından gözlenmiştir. Bu proje ile busulfan'ın yan etkisi olarak meydana gelen azosperminin tedavisi için etkin olabilecek bir yöntem geliştirilmesi hedeflenmiştir. Busulfan'ın bir kemoterapik ajan olarak yaygın kullanılmasına ve bununla ilgili çok fazla araştırmaya rağmen maruz kalan bireylerin testis dokularında kan-testis bariyer bütünlüğü ve proinflamatuar yolak üzerindeki etkileri hakkında literatürde yetersiz bilgi bulunmaktadır. Bu çalışma, busulfan'ın yetişkin Wistar sıçanlarda testisler üzerindeki etkilerini histolojik, immünohistokimyasal ve biyokimyasal açıdan incelemek ve olası hasarın mekanizmalarını ortaya koymak için tasarlanmıştır. Ek

olarak, güçlü immünomodülatör etkilere, daha yüksek proliferatif potansiyele sahip olan ve çeşitli antioksidan/antiinflamatuar sitokinler/büyüme faktörleri salgılayan ve aynı zamanda düşük immünojenik ve tümör oluşumu açısından risk taşımayan eksozomların busulfan'dan etkilenmiş erkek üreme sistemi üzerine koruyucu etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca uyarılmamış iWJ-MKH eksozomları ve sitokin kompleksi ile uyarılmış iWJ-MKH'inden izole edilen eksozomlarının testiküler hasar karşısında etkileri kıyaslanacaktır. **Sonuç olarak;** bu çalışma erkek üreme sisteminde infertiliteye sebep olan muhtemel testiküler hasar mekanizması ve uyarılmış/uyarılmamış iWJ-MKH eksozomlarının iyileştirici rolünü inceleyen **ilk çalışma** olacaktır. Bu çalışmanın; erkek kaynaklı infertilitede busulfan maruziyetinin patofizyolojisinin daha iyi anlaşılmasına ve bilinen güçlü bir antioksidan/antiapoptotik/antiinflamatuar olan iWJ-MKH eksozomlarının olası hasarı iyileştirmeye yönelik etkilerinin gösterilmesinde literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

3. YÖNTEM

3.1. MKH Karakterizasyonu ve Çoğaltılması

İnsan wharton jeli mezenkimal kök hücreleri (iWJ-MKH) KÖGEM hücre koleksiyonundan kullanılmıştır. iWJ-MKH'leri deneye başlamadan önce karakterizasyon işlemleri tekrarlanmıştır. Bu amaçla kültüre edilen iWJ-MKH'lerin yüzey belirteçleri akım sitometrik olarak değerlendirildi, sonrasında osteojenik ve adipojenik farklılaştırmaya alınarak karakterizasyonları tamamlanmıştır. Wharton jelinden elde edilen MKH'leri kültür ortamına ekilip %70-80 yoğunluğa geldiğinde %0.25 tripsin/EDTA (Gibco) kullanılarak hücreler kaldırılarak tekrar pasajlandı ve 3-10. pasajlar arasında deneysel protokoller için kullanılmıştır. Her pasaj arasında, canlılık tripan mavisi ile boyanarak hücre sayma cihazında ölçülmüştür. Hücreler, %1 Glutamax, %10 fetal sığır serumu (FBS) (Gibco), %1 penisilin/streptomisin (Capricorn) içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) (Gibco) besiyeri ile steril koşullar altında %5 CO^2 ve 37 °C' de nemlendirilmiş bir inkübatörde kültüre edilmiştir. Elde edilen kök hücreler, akım sitometri analizi ve farklılaştırma deneyleri kapsamında MKH karakterizasyonu gerçekleştirilmiştir.

3.1.1. Akım Sitometrik Analiz

iWJ-MKH'in fenotipik özelliklerinin belirlenmesi ve yüzey antijenlerinin tanımlanması amacıyla akım sitometri yöntemi kullanılmıştır. Hücreler 3. pasaja geldiklerinde, akım sitometri cihazı kullanılarak analizleri gerçekleştirilmiştir. Hücreler tripsin ile muamele sonrasında sayılarak her bir antikor için yaklaşık $0{,}2x10^6$ hücre/200µl besiyerinde olacak şekilde tüplere alınmıştır. Her tüpe ilgili floresan izotiyosiyonat (FITC)- ve fikoeritrin (PE) konjuge monoklonal antikorlar (CD13, CD15, CD29, CD34, CD44, CD45, CD73, CD90, CD106, HLA-DR) ve uygun izotip kontrollerinden (IgG1, IgG1/G2a) 10µl eklenerek 45 dakika inkübe edilmiştir. İnkübasyon sonrası, %0,1 sodyum azid içeren PBS eklenmiş, 1800rpm'de 5 dakika santrifüj edilerek bağlanmayan antikorlar uzaklaştırılmıştır. Ardından hücreler, 400µl yıkama çözeltisi ile sulandırılarak FACS Calibur (BD Biosciences) akım sitometri cihazında okutulmuş ve BD Cell Quest TM software programı ile analizi gerçekleştirilmiştir. iWJ-MKH karakterizasyonunda yukarıda sayılan monoklonal antikorlar işaretlenerek akım sitometri cihazında değerlendirilmiştir. Akım sitometri cihazında

belirteçler istenilen gibi olduğunda hücreler karakterizasyonun diğer bir aşaması olan adipojenik ve osteojenik farklılaşmaya alınmıştır.

3.1.2. Farklılaştırma Deneyleri

In vitro Adipojenik Farklılaştırma

Hücreler P3'de tripsin enzimi ile kaldırılıp sayılarak 6 kuyucuklu doku kültür kaplarında 3x104 hücre/cm^2 yoğunlukta, tip I kollajen kaplı lamellere ekilmiştir. Hücreler %50-60 doygunluğa ulaştıktan sonra besiyeri, %10 FBS, 0.5 mM isobutilmetilksantin (IBMX, Sigma, ABD), 10-6M deksametazon (Sigma, ABD), 10 µg/ml insulin, 200 µM indometazin (Sigma, ABD) ve 1% penisilin-streptomisin eklenmiş DMEM-LG (Capricorn, Almanya) ile değiştirilerek adipojenik farklılaşma uyarılmıştır. Besiyeri, haftada iki kez değiştirilerek 3 hafta süresince hücreler gözlemlenmiştir. Bu süre sonunda, besiyeri uzaklaştırılarak yuvarlak lameller PBS ile 3 kere yıkanmış, %4'lük paraformaldehitle 30 dakika süreyle fiksasyon işlemi uygulandıktan sonra tekrar PBS ve distile su ile yıkanmıştır. 300 mg oil red O, 100 ml izopropanol (%99) içinde çözülerek %3'lük oil red O solüsyonu hazırlanmıştır. Bu solüsyon 3/2 oranında distile su ile seyreltilmiş ve 0,22µm por çaplı filtre ile süzülüp çalışmada kullanılmıştır Lameller, izopropanolda (%60 v/v) 5 dakika bekletildikten sonra 50 dakika süresince hücrelerdeki nötral lipidler icin özgün olan oil red O çözeltisi ile muamele edilmiştir. Daha sonra %30'luk izopropanol ile muamele edilip tekrar distile su ve fosfat tamponlu salin (PBS) ile yıkamanın ardından örnekler kuruduktan sonra 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) ile lamların üzerine kapatılmıştır. Boyanmış lipid damlacıkları ve hücre morfolojisindeki değişimler faz-kontrast mikroskobu (Olympus IX71, Japonya) altında değerlendirilerek, hücrelerin adipojenik farklılaşma düzeyleri incelendi. Mikroskobik görüntülemede, yağ damlacıkları kırmızı renkte ve hücrelerin nukleusları mavi renkte gözlenmiştir.

In vitro Osteojenik Farklılaştırma

Karakterizasyon için iWJ-MKH'leri P3'de 3x10^4 hücre/cm^2 yoğunlukta, 6 kuyucuklu doku kültür kaplarında tip I kollajen kaplı lamellere ekilmiştir. Hücreler %70-80 doygunluğa ulaştıktan sonra çoğalma besiyerleri osteojenik farklılaşma besiyeri ile değiştirilmiştir. Osteojenik uyarma besiyeri olarak %10 oranında FBS, 10-8 M deksametazon, 50 µg/ml askorbat-2-fosfat, 10 mM β-gliserofosfat, %1 penisilinstreptomisin eklenmiş düşük glukozlu DMEM-LG kullanılmıştır. Haftada iki kez besi ortamı tazelenmiş ve hücrelerin morfolojileri

zıt-faz mikroskopta düzenli olarak izlenmiştir. Farklılaştırmanın 21.günü hücrelerin kültürüne son verilmiştir. Alizerin red S boyaması (%0,02'lik) için 20 ml distile suda; 0,4 mg alizarin red-S çözülmüş ve 0,22 µm filtre ile süzülmüştür. Hidrojen peroksit (%10 oranında) eklenip, pH 4,1-4,3 olarak ayarlanarak kullanılmıştır. Zıt faz mikroskopta kırmızı kalsifiye nodüller saptanmıştır. Kalsifiye nodüller ve hücre morfolojisindeki değişimler faz-kontrast mikroskobu (Olympus IX71, Japonya) altında değerlendirilerek, hücrelerin adipojenik farklılaşma düzeyleri incelendi.

3.2. iWJ-MKH'lerinin sitokinler ile uyarımı

IFN-y, IL-1β ve TNF-α ile önceden uyarılmış MKH'den eksozom elde etmek için, 4-10 pasaj arası iWJ-MKH'leri T175 kültür flasklarına ekilmiş ve %80-90 yoğunluğa ulaşmasına izin verilmiştir. Daha sonra hücreler, 48 saat boyunca IFN-y, IL-1β ve TNF-α (her biri 10 ng/ml) (İnvitrogen) ile işleme tabi tutulmuştur. Daha sonra, besiyeri uzaklaştırılmış ve hücreler, PBS ile yıkanmıştır. Ardından hücrelere DMEM-F12 besiyerine FBS olmasan sadece %1 antibiyotik çözeltisi eklenerek ilave edilmiştir. Hücreler 24 saat boyunca inkübe edilmiş ve besiyeri toplanmıştır (Zhu ve ark., 2014; Joo ve ark., 2020) ve eksozom izolasyonu işlemine tabi tutulmuştur.

3.3. MKH eksozomlarının izolasyonu ve karakterizasyonu

Eksozom izolasyonunda; yüksek verim ve saflıkta eksozom izolasyonu sağlayan diferansiye ultrasantrifüjleme tekniği kullanılmıştır. Çalışma prensibi; MKH kültüründen alınan besiyeri, yüksek devirde santrifüj ile merkez kaç kuvvetine maruz bırakılarak; içeriğindeki eksozomların, sahip oldukları yoğunluk, şekil ve boyut farkıyla; büyük biyopartiküller, proteinler ve protein/RNA agregatları gibi veziküler olmayan parçacıklardan ayrılması temeline dayanmaktadır.

iWJ-MKH kültür kapları %80 doluluğa ulaştıktan sonra besi ortamları döküldü ve PBS ile iki kez yıkanarak FBS kaynaklı eksozom ve mikroveziküller uzaklaştırılmıştır. MKH"ler FBS içermeyen besi ortamı (%1 Pen/Strep ve %1 glutamaks eklentili DMEM/F12) ile 48 saat kültüre edilmiştir. Süre sonunda MKH kültür besiyerleri falkon tüplerde toplanmıştır. Bu aşamada, ön saflaştırma işlemini ve takiben ultrasantrifüjle devam eden bir eksozom saflaştırma protokolü izlenmiştir (Lasser C ve ark., 2012). Toplanan MKH kültür besiyerleri 300 g"de 10 dakika süreyle santrifüj edilip, supernatant yeni tüplere aktarılıp ölü hücreler

uzaklaştırılmıştır. Takiben 15.000 g‟de 20 dakika süreyle santrifüj edilip, supernatant yeni tüplere aktarılarak, hücresel atıklar uzaklaştırılmıştır. Supernatant 0.22 µm por boyutlu filtreden (BIOFIL, Çin) geçirilerek, 220 nm‟den büyük mikroveziküller uzaklaştırılmıştır. Ön saflaştırma işlemleri tamamlanan hücre besiyerleri; CS150FNX (Hitachi Himac, Japonya) ultrasantrifüj cihazı ve S50A model rotor kullanılarak 4°C‟de, 120.000 g‟de ve 70 dakika süreyle ultrasantrifüj işlemi gerçekleştirildi. Supernatant uzaklaştırıldı ve pellet haldeki eksozom az miktarda (~100-600 µl) PBS ile homojenize edildi. Elde edilen eksozomlar, akım sitometri analizi ve elektron mikrokobu ile karakterize edilmiştir. Mikro-BCA testi ile toplam protein içeriği ölçülmüştür. Kullanımı ileri bir tarihte gerçekleşecek olan; MKH kültür besiyerleri ve izole edilen eksozomlar -80°C soğutucuda (Sanyo MDF-U5386S, Japonya) muhafaza edilmiştir.

3.3.1. Eksozomların Akım Sitometri ile İmmünofenotipik Karakterizasyonu

İzolasyonu yapılmışaktif ve aktif olmayan iWJ-MKH'lerden elde edilen total eksozomlarının bir kısmı, eksozom yüzey belirteçleri olarak bilinen CD9, CD63 ve CD81 fenotiplerinin incelenmesi üzerine akım sitometri analizine alındı.

Test tamponu için %0.1BSA (Sığır serum albumin) içeren PBS hazırlandı ve 0.22 µmfiltreden geçirildi. Her eksozom örneği için; CD9, CD63, CD81 ve izotip kontrol olmaküzere 4 tüp hazırlandı. CD 9 (Invitrogen, Litvanya), CD 63 (Invitrogen, Litvanya), CD 81(Invitrogen, Litvanya) „Dynabeads‟ (Manyetik boncuk) solusyonlarından 20 µl, hazırlanmış tüplere konuldu. Test tamponu ve manyetik ayırıcı (StemCell Technologies) aracılığıylamanyetik boncuklara yıkama işlemi yapıldı. Her bir belirteç için 10 µl eksozom örneğitüplere dağıtıldı. Üzerine 90 µl test tamponu ilave edildi ve orbital çalkalayıcıda (Biosan)+4°C‟de gece boyu inkübe edildi ve bu süreçte eksozomlar ile antikorlarla kaplı olanmanyetik boncukların kompleks oluĢturması sağlandı (Çizim 3.5). Süre sonunda, tüplere1'er ml test tamponu ilave edilip vortekslendi. Her tüp sırayla manyetik ayırıcıyayerleştirildi ve 2 dakika süreyle eksozomların manyetik boncuklar ile tüp yüzeyinetutunması sağlandı. Test tamponu uzaklaştırılarak, yıkama işlemi tamamlananeksozom+manyetik boncuk kompleksleri test tamponuyla yeniden homojenize edildi. Uygun miktarlarda CD9 (BD Biosciences), CD81 (BD Biosciences), CD63 (BD Biosciences) ve IgG1 (BD Biosciences) antikorları ilave edildi ve orbital çalkalayıcı üzerinde, oda ısısında,45 dakika süreyle inkübe edildi. Antikorlar ile boyanan eksozom+manyetik boncuk komplekslerine; test tamponu ve manyetik ayırıcı aracılığıyla

bir kez yıkama işlemiyapıldı. Test tamponu ile yeniden homojenize edilen eksozomlar; FACS Calibur (BDBiosciences) cihazında okutuldu, CellQuest programında (BD Biosciences) analizişlemleri gerçekleştirildi.

3.3.2. Zetasizer Cihazı ile Partikül Boyut Analizi

1 ml PBS içerisinde -20 °C'de saklanan eksozomlar oda ısısında çözdürüldükten sonra içerisinden 10 ul alınarak KOÜ Kimya Laboratuvarında bulunan Zetasizer cihazı (Malvern, UK) ile boyut analizi gerçekleştirilmiştir.

3.4. Mikro-BCA Testi ile Eksozom Miktar Tayini

Bikinkoninik asit (BCA) yöntemi, alkali çözeltideki proteinlerin 'Biüret' reaktifi ile Cu+2'den Cu+1'e indirgenmesi ve protein miktarıyla orantılı olarak, yeşilden mora dönüşen renk değişiminin spektral ölçümüne dayanan kalorimetrik bir testtir.

iWJ-MKH besiyerlerinden elde edilen eksozomların miktar tayini, ticari 'SMARTTM micro BCA Protein Assay Kit' (Intron Biotechnology, Kore) ile, üreticinin sunduğu talimatlara uyularak gerçekleştirilmiştir. Kısaca; 96-kuyucuklu plakaya; standart dilüsyonlar ve örnekler yüklendi. Üzerine (1:1) oranda 'Working' solüsyon ilave edilip, 37°C ayarlı çalkalamalı inkübatörde (Finepcr-combi-SV120, Kore) 2 saat süreyle inkübe edildi. Eksozom örnekleri, mikroplaka okuyucuda (Versamax, ABD) 562 nm dalga boyunda okutularak kromojenik reaksiyon ölçümü yapıldı. Örneklerin protein konsantrasyonları; ölçülen absorbans değerleri, standart eğrisi ile karşılaştırılarak değerlendirilmiştir.

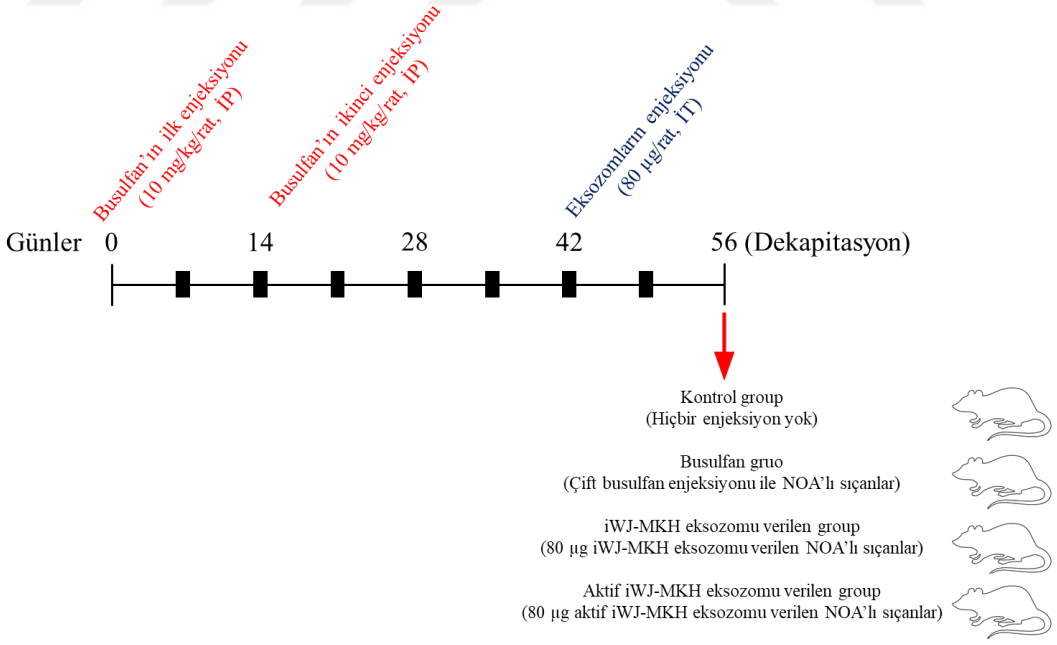
3.5. In vivo Deney protokolü

Bu çalışmanın gerçekleştirilebilmesi için Kocaeli Üniversitesi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (KOÜ HADYEK 8/1-2020). Kocaeli Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi'nden temin edilen toplam 40 adet erişkin erkek Wistar sıçanlar (250-300 gr) deneye dahil edildi. Tüm gruplarda n=10 olacak şekilde rastgele 4 gruba ayrıldı.

3.5.1. Deney Gruplarının Oluşturulması

Genel olarak, 4 deney grubu şu şekilde tasarlanmıştır (Şekil 3.1):

- **Kontrol grubu (Knt):** Sıçanlara deneyin başında tek doz 0.5 ml PBS intraperitoneal (i.p) olarak enjekte edildi ve deney sonuna kadar (8 hafta) tedavi edilmeden standart koşullarda bekletildi.
- **Busulfan grubu:** Busulfan ilk olarak 10 mg/ml'lik bir konsantrasyonda dimetil sülfoksit (DMSO) içinde çözülerek ve ardından 0.5 ml PBS (sıçan başına enjeksiyon hacmi) içinde seyreltilerek hazırlanmıştır. Çitf doz 10 mg/kg busulfan ajanı sıçanlara i.p olarak verildi (birinci doz 0. gün, ikinci doz 14. gün).
- **Busulfan+iWJ-MKH eksozomları verilen tedavi grubu (Busulfan+Ekso):** In vitro iWJ-MKH'i hücre ekimi esnasında hiçbir şekilde uyarılmadı ve yukarıda in vitro aşamalarda anlatıldığı gibi eksozom izole edildi ve karakterize edildi. Daha önceki çalışmalara göre belirlediğimiz 80 μg toplam eksozom proteinleri busulfan uygulamasından 5 hafta sonra sıçanlara i.t olarak verildi.
- **Busulfan+aktif iWJ-MKH eksozomları verilen tedavi grubu (Busulfan+A.ekso):** in vitro iWJ-MKH'i yukarıda anltıldığı gibi sitokin kompleksiyle uyarıldı ve sonucunda üretilen eksozomların izolasyonu sağlandı. Bir önceki grupta olduğu gibi 80 μg toplam eksozom proteinleri busulfan uygulamasından 5 hafta sonra sıçanlara i.t olarak verildi.



Şekil 3. 1. Deneyin şematik gösterimi.

3.5.2. Deneyin oluşturulması

Birbirine yakın ağırlıklara (250-300 g) sahip 8-10 haftalık sıçanlar (n=40) 4 gruba ayrıldı; Kontrol (n=10), busulfan (n=10), Busulfan+iWJMKH-Ekso (n=10) ve Busulfan+iWJMKH-A.ekso (n=10). **Kontrol grubunda**, sıçanlara hiçbir müdahalede bulunulmadı ve deney sonuna kadar (8 hafta) tedavi edilmeden yaşamaya devam etti. **Busulfan verilen hasar grubundaki** sıçanlara, ciddi immünsupresyon olmaksızın germ hücrelerine zarar vererek azospermiyi indüklemek için sekansiyel çift doz 10 mg/kg busulfan intraperitoneal olarak enjekte edildi. İlk doz 0. günde i.t. olarak enjeksiyon edildi, ikinci doz 14. gün aynı hacimde i.p. olarak enjekte edildi. Bu enjeksiyondan sonra busulfan grubundaki sıçanlara hiçbir tedavi içeriği enjekte edilmedi ve 8. haftaya kadar bekletildi. **Busulfan+iWJMKH-ekso grubuna** busulfan enjeksiyonundan 5 hafta sonra tek doz uyarılmamış 80 μg toplam eksozom proteinleri i.t enjeksiyonu yapılırken, diğer taraftan **Busulfan+A.ekso grup** (n=10) hayvanlarına, aynı şekilde busulfan enjeksiyonundan 5 hafta sonra uyarılmış 80 μg eksozom protein enjeksiyonu yapıldı. İntratestiküler tedavi uygulamalarında enjeksiyonlar, anestezi altında (90 mg/kg Ketamin ve 10 mg/kg Xylazine) her testisin tunika albungia bölgesine zarar vermeden üst ve alt polden olacak şekilde direkt olarak yapıldı.

Deneyin sonunda (8. Hafta) deney hayvanlarında herhangi bir ölüm gerçekleşmedi. Anestezi altında sakrifiye edilen hayvanların sağ/sol testis ve epididimleri ayrı ayrı alındı. Sol testis makroskopik olarak tartılıp not edildikten sonra histolojik değerlendirmelerde kullanılmak üzere distile su ile yıkama yapıldıktan sonra %10'luk formalin solüsyonuna alındı. Sağ testis ise biyokimyasal analizler için -80 derecede saklanmak üzere ayrıldı. Intrakardiyak ponksiyon ile yaklaşıkk 1 cc kan temini sağlandı. Kanlardan serumlar santrifüj aracılığı ile ayrıldı ve serum örnekleri de çalışılana kadar -80'de depolandı.

3.6. Histolojik ve İmmünohistokimyasal Analizler

Sıçanlardan alınan sol testis dokuları %10 nötral tamponlu formalinde 48 saat boyunca fikse edildi ve ardından 1 gece akan çeşme suyunda bekletildi. Daha sonra dokular sırasıyla %70, %90, %96 ve %100 oranında alkollerde dehidrate edilip toluen ile şeffaflandırıldı. Sıcak parafinde en az 2 saat bekletilerek kasetlere gömüldü. 4 mikron kalınlığında kesitler alındı ve aşağıdaki değerlendirmeler yapılmıştır:

1) Genel histolojik değerlendirme; Hematoksilen&Eozin (H&E) ve Periyodik asit-Schiff (PAS) boyaması
2) İmmünohistokimyasal analiz ile spermatogenez ve apoptoz/proliferasyon değerlendirmesi

3.6.1. Genel histolojik değerlendirme

Preparasyonu yapılan sol testis dokusundan her 10 kesitte 1'i seçilerek toplamda 3 kesit alınmıştır. Kesitler H&E ile boyanıp entellan ile kapatıldıktan sonra mikroskopta incelemeye hazır hale getirilmiştir. H&E ile boyanan testis dokularının pratik ve geçerli bir değerlendirmesi için rastgele 25 tübüler kesit alınmıştır. Kesitlerin değerlendirmesi için Johnsen skor (Tablo 3.1) tablosu kullanılacaktır. Bu skor sistemine göre tanısal testis örneklerine 1 ile 10 arasında bir puan verilecektir. Puanlama gruplar bilinmeden kör bir şekilde yapıldı. Çok sayıda spermatozoanın bulunduğu tam spermatogenez puan 10 ve tübüler sklerozlu seminifer epitel yokluğu puan 1 olarak değerlendirilecektir. Kesitler daha sonra ışık mikroskobu (LEICA DM 1000) ile incelenerek fotoğraflandı ve skorlandı.

Tablo 3.1. Johnsen skor tablosu (Ramesh ve ark. 2023)

Skor	**Spermatogenez Seviyesi**
10	Tam spermatogenez
9	Biraz bozulmuş spermatogenez
8	Tübül başına beşten az spermatozoa
7	Geç spermatid yok; birçok erken spermatid
6	Spermatozoa yok; sadece birkaç spermatid (<5-10)
5	Spermatozoa ve spermatid yok; birkaç veya çok sayıda spermatosit
4	Spermatozoa ve spermatid yok; sadece birkaç spermatosit
3	Sadece spermatogonyum
2	Germ hücrelerinin yokluğu; sadece sertoli hücreleri
1	Seminifer epitel hücrelerinin yokluğu; tübüler skleroz

3.6.2. İmmünohistokimyasal Analiz

Testis dokularında gözlenebilecek değişikliklerin olası mekanizmaları hakkında bilgi sahibi olabilmek amacıyla spermatogenez (Dazl, Vasa ve Miwi) ve apoptoz/proliferasyon ile ilişkili (sırasıyla aktif Kaspaz-3 ve PCNA) antikorlar ile immünohistokimyasal boyama

işlemi uygulanmıştır. İmmünohistokimyasal incelemeler için fikse edilmiş ve parafine gömülmüş bloklardan alınan kesitler 1 gece boyunca 37°C' lik etüvde bekletildi, deparafinize etmek amacıyla ksilende 2x10 dakika tutuldu, saf alkol ve %96'lık alkolde 2x10 dakika bekletildikten sonra metanol ile hazırlanmış %3'lük hidrojen peroksitte 10 dakika bekletilerek endojen enzim blokajı yapıldı. Distile suda yıkama işleminden sonra antijen geri kazanımı sitrat tamponda 20 dakika 200 W mikrodalgaya maruz bırakıldı. Oda ısısında soğutulan kesitler PBS ile 2 kere 5'er dakika yıkandıktan sonra bloklama solüsyonunda 10 dakika bekletildi. Primer antikorda 1 gece boyunca +4 ˚C buzdolabında bekletildi (Tablo 3.2), sonrasında 2 kere 5'er dakika PBS'de yıkandıktan sonra biotinlenmiş sekonder antikorda 20 dakika tutuldu, daha sonra PBS ile yıkanma sonrası DAB kromojeninde 2 dakika bekletildi. Distile suda yıkama işleminden sonra, Mayer Hematoksilende (MERCK) 20 sn bekletildi ve çeşme suyu ile kesitler yıkandı. %96 lık alkolde 2x10 dakika bekletildikten sonra kesitler entellan ile kapatıldı. Boyamalar daha sonra ışık mikroskobu (LEICA DM 1000) ile incelenerek fotoğraflandı.

Tablo 3. 2. Kullanılan primer antikorların detayları.

Antikorlar	**Dilüsyonları**	**Markaları**
Aktif-kaspaz3	WB (1:200) İHC (1:10)	Merck (AB3623)
Proliferatif hücre nükleer antijeni (PCNA)	WB (1:10000) İHC (1:1000)	Abcam (ab92552)
Piwil (Miwi)	WB (1:1000) İHC (1:50)	Invıtrogen (PA5-17034)
Ddx4	WB (0.1-0.5 µg/mL) 0.5-1 (µg/mL)	Invıtrogen (PA5-79147)
Dazl	WB (1:500) İHC (1:50)	Invıtrogen (MA5-32708)
Zonula okludens (ZO-1)	WB (1:200)	Invıtrogen (14-9776-82)
Okludin	WB (1:3000)	Affinity Biosciences (BF8330)

3.7. Biyokimyasal Analiz

3.7.1. Serumda IL-1β, IFN-γ ve TNF-α ölçümü

Fotometrik enzim-immuntest, sıçan serumunda proinflamatuar sitokin düzeyi ölçülerek testiküler hasarda ve olası tedavi sonrasında inflamasyon hakkında bilgi sahibi olunmasını amaçlamaktadır.

Deney sonundan alınan kalp kanı, 3.000 RPM'de 15 dakika santrifüjlendi ve analiz zamanına kadar -20 ºC'de saklandı. Serum örneklerinde IL-1β, IFN-γ ve TGF-αseviyelerine ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (BT lab) yöntemiyle bakıldı. -20 ºC'de saklanan serum örnekleri çözdürüldü fakat ısısının 2-8 ºC'de tutulmasına özen gösterildi. Deney başlamadan örnekler tekrar yaklaşık 20 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilerek dikkatli bir şekilde süpernatantları toplandı. Standartlar her bir kit prosedürüne göre seyreltilerek hazırlandı. Reaktiflerimiz de kit içerisinde hazır durumdaydı. Kuyucuklara standartlar 50 µl konuldu, kör olarak ilk kuyucuğa hiçbir şey konulmadı. Test edilecekler örnekler ise 40 µl örnek çözücü+10 µl örnek olacak şekilde kuyucuklara konuldu ve hafifçe karıştırıldı. 37 0C'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her küvete 0,35 ml yıkama solüsyonu konuldu ve sonrasında sirkeleyerek yıkama solüsyonu döküldü ve ters çevirerek havlu kağıda solüsyon boşaltıldı. Bu işlem 5 kere tekrar edildi. Her bir kuyucuğa (kör kuyu hariç) 50 µl HRP-konjugat reaktifi eklendi ve 37 ºC'de 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrası bir önceki basamaktaki gibi yıkama işlemi gerçekleştirildi. Yıkama yapıldıktan sonra kör ve standartlar da dahil olmak üzere her kuyuya önce kromojen solüsyon A 50 µl, sonra ışıktan korunması gereken kromojen solüsyon B karanlık ortamda yine 50 µl olacak şekilde eklendi. Karışması için nazikçe çalkalandı ve 10 dk 37 ºC'de inkübe edildi. 10 dk'lık inkübasyon sonrasında her bir kuyuya 50 µl durdurma solüsyonu eklendi. Durdurma solüsyonu koyduktan sonra 15 dakika içerisinde ölçüm yapılması gerektiği için hemen ELISA reader'a (Epoch Biotek®) alındı. 450 nm'de ELISA Reader yardımıyla ölçüm yapıldı. Absorbansların elde edilmesinin ardından absorbans-konsantrasyon grafiği çizildi.

3.7.2. Testis dokusunda MDA, GSH ve MPO düzeylerinin ölçümü

Fotometrik enzim-immuntest in-vivo doku çalışmasında, sağ testiste MDA, GSH ve MPO düzeylerinin tayin edilmesi ile azospermi modelinde oluşabilecek oksidan hasarın düzeyi ve eksozomların etkilerinin gösterilmesini amaçlamaktadır.

Deney sonundan alınan sağ testis doku örneklerindeki MDA, GSH ve MPO seviyelerine ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) (BT Lab) yöntemiyle bakıldı. Dekapitasyon sonrası alınıp -20 ºC'de saklanan dokular çözdürüldü fakat ısısının 2-8 °C'de tutulmasına özen gösterildi. Dokular küçültüldü ve ağırlığı tartıldı. Bir tüpün içerisine doku yerleştirilip üzerine %10'luk homojenat olarak PBS (pH 7.4) eklendi ve homojenizatör ile örnekler homojenize edildi. Yaklaşık 20 dakika 3000 rpm'de santrifüj edilerek dikkatli bir şekilde süpernatantları toplandı. Daha sonraki basamaklar '3.7.1. Serumda IL-1β, IFN-γ ve TNF-α ölçümü' bölümünde detaylı anlatıldığı gibi deney gerçekleştirildi.

3.8. Western Blot Analizi

Western blotlama 4 adımdan oluşmaktadır; ilk adımda proteinler çözünür halde hücre dışına çıkarılır. İkinci adımda, proteinler bir jel üzerinde protein ağırlıklarına göre ayrıştırılır. Üçüncü adımda, ayrıştırılan proteinler bir membran üzerine transfer edilir. Son adımda; aranılan proteinler özel antikorlar yardımıyla membran üzerinde görüntülenir.

3.8.1. Protein özütlerinin eldesi

-80'de depolanan sağ testis doku örneklerinden küçük parçalar alınarak PBS'de parçalandı 7000 g'de 10 dk santrifüj edildi. Üst sıvı alınarak RIPA tamponu (Thermo Fisher Scientific) ilave edilerek bu tampon içerisinde 2 saat süspanse edildi. Bütün işlemler buz üzerinde gerçekleştirildi. Süspansiyon sonrası 0,2 ve 0,5 mm'lik paslanmaz çelik boncuklar konuldu (NextAdvance, ABD) ve örnekler +4°C'de bulunan homojenizatör yardımı ile (Next Advance Bullet Blender, ABD) lizize uğratıldı. Liziz sonrası örnekler 10.000xg'de 10 dakika santrifüj edildi ve çözünür proteinleri içeren süpernatant kısmı dikkatli bir şekilde yeni tüplere aktarıldı. Elde edilen protein özütlerinin konsantrasyonları Bradford yöntemi ile belirlendi ve örneklerin SDS-PAGE analizleri yapılarak protein üretimi ve kalitesi kontrol edildi.

3.8.2. SDS-PAGE ve Western Blotting

Protein kalitesini belirliyebilmek amacıyla SDS-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve sonrasında da Western blotting uygulamaları yapıldı. 30 µg total protein lizatı 6X sample yükleme tamponu ile karıştırıldı proteinleri denatüre etmek amacıyla 95 ºC'de 5 dk inkübe edildikten sonra örnekler kuyulara yüklendi ve jel yürütüldü. %8 SDS-PAGE ile ayrıştırılan proteinlerin jelden nitroselüloz membrana aktarılması 45 dakika 180 V elektrik

akımı ile gerçekleştirildi. SDS-PAGE ile protein kalitesi doğrulandıktan sonra yapılan trransfer sonucu transfer verimliliği renkli markör kullanılarak ve membran Ponceau S ile boyanarak belirlendi. Membran 1X TBS-T içerisinde 2-3 dk bekletildikten sonra, %5 (w/v) yağsız süt tozu içeren 1X TBS-T içerisinde, 18-20 rpm'de oda sıcaklığında 1-1.5 saat çalkalanarak bloklama işlemi gerçekleştirildi. Membran 1X TBS-T ile üç kez (10 dk süreyle) 18-20 rpm'de çalkalanarak yıkandı. Membran, 1X'lik TBS-T içerisinde belirlenen oranlarda seyreltilerekhazırlanan primer (birincil) antikor ile +4ºC'de gece boyu 18-20 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi (Tablo 3.2). Primer antikor ile inkübasyonun ardından membran 1X TBS-T ile 3 kez yıkandı. Membran, 1X TBS-T içerisinde belirlenen oranlarda seyreltilerek (anti-rabbit IgG 1:10000, anti-mouse IgG 1:10000 oranında, sırasıyla) hazırlanan HRP-konjuge sekonder (ikincil) antikor ile +4oC'de 1,5 saat 18-20 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi. Sekonder antikor ile inkübasyonun ardından 1X TBS-T ile 3 kez yıkanan membran, ECL (hidrojen peroksit+lüminol) kullanılarak membrana ait film geliştirildi.

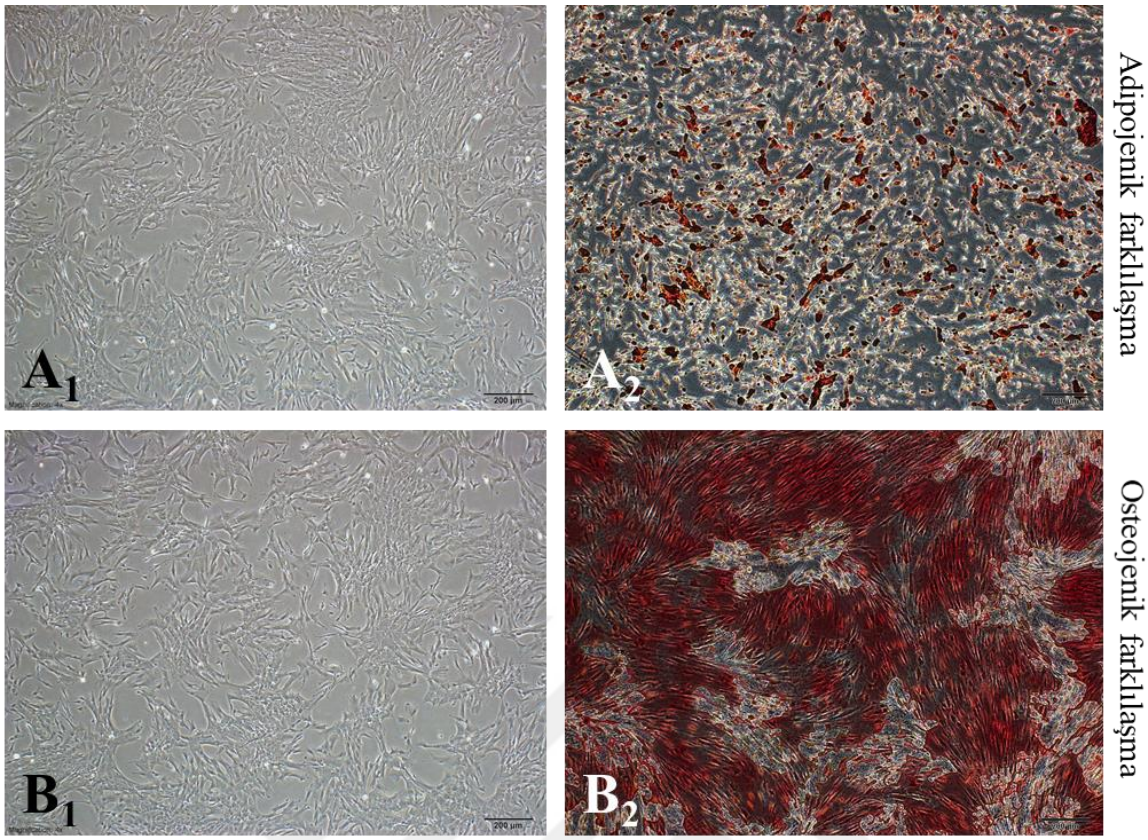
3.9. İstatiksel Analiz

Histolojik ve biyokimyasal değerlendirmelerden alınan verilerin değerlendirmesi Graph-Pad Prism8.2 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) programı kullanılarak yapıldı. İstatistiksel analizler için Tek yönlü ANOVA ve Tukey/Bonferroni post Hoc testleri ile student t testi kullanıldı.

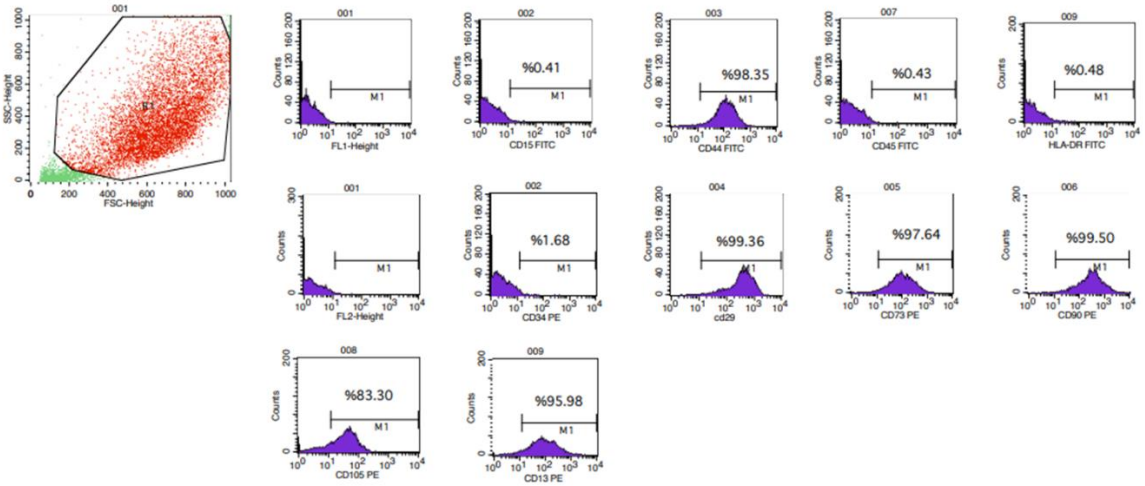
4. BULGULAR

4. 1. MKH Karakterizasyonu ve Çoğaltılması

Birincil iWJMKH doku eksplant yapışma yöntemiyle izole edildi ve kültürlendi. Hücreler, trypsin sindirimi kullanılarak 3. pasaja aktarıldı ve pasajlamadan sonra hızla büyüdü (Şekil 4.1A_1-B_1). Hücreler mikroskobik olarak mekik şeklindeydi ve dönen bir dağılımla eşit ve yakından düzenlenmişti; bu, iWJMKH'in izolasyonunun ve kültürünün yüksek saflıkta olduğunu ortaya koydu. iWJMKH, sırasıyla lipojenik ve osteojenik kaynaklı hücreleri oil red O ve alizarin red ile boyayarak adipositlere (Şekil 4.1A_2) ve kalsiyum tuzu granüllerine (Şekil 4.1B_2) başarıyla farklılaştı. İndüklenen hücrelerin morfolojisi, iWJMKH'in tipik uzatılmış morfolojisinden uzaklaştı. Bu sonuçlar iWJMKH'in farklılaşma fonksiyonunu göstermektedir. iWJMKH'in yüzeyindeki moleküler belirteçlerin sonuçları, yüzey belirteçleri CD44, CD29, CD73, CD90, CD105 ve CD13 için pozitif oranların sırasıyla %98,35, %99,36, %97,64, %99,50, %83,30 ve %95,88 olduğunu gösterdi. MKH negatif belirteçleri CD15, CD45 ve CD34'ün ekspresyon oranları sırasıyla %0,41, %0,43 ve %1,68 idi (Şekil 4.2). Akış sitometri sonuçları MKH'in temel özellikleriyle tutarlıydı ve sonraki deneylerin gereksinimlerini karşıladı.



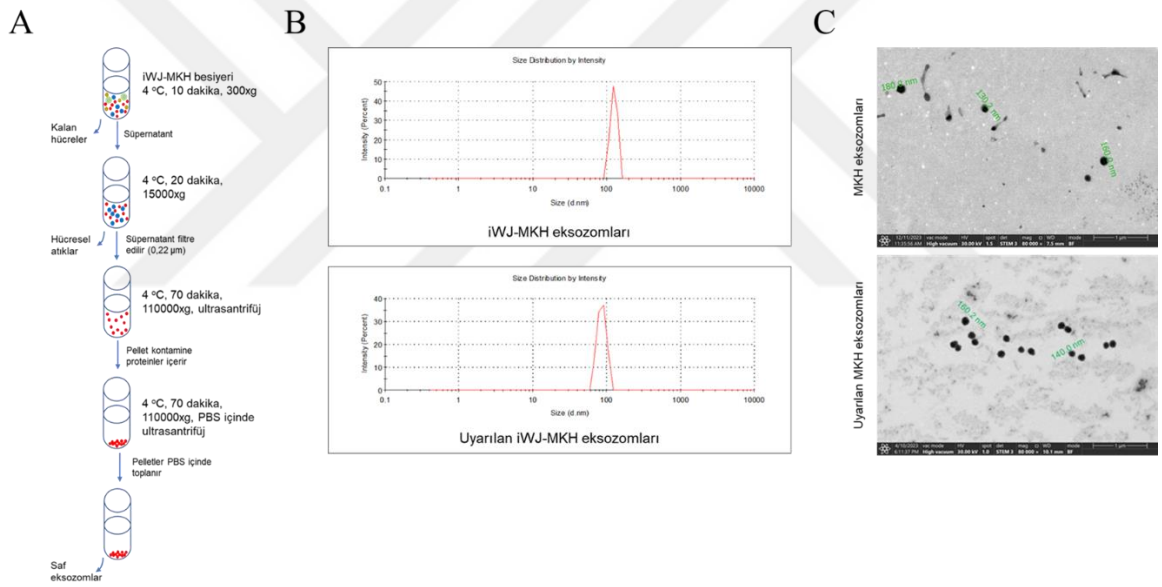
Şekil 4. 1. İnsan Wharton jeli mezenkimal kök hücrelerinin (iWJMMKH) izolasyonu, kültürü, adipojenik ve osteojenik farklılaşması. A_1 ve B_1: Pasaj 3'te olan MKH'lerin 72 saat inkübasyon sonrası ışık mikroskobik morfolojisi. A_2: Adipogenik farklılaşma sonrası MKH'lerin oil-red O ile boyanması. B_2: Osteojenik farklılaşma sonrası MKH'lerin Alizarin-red ile boyanması. Ölçek: 200 µm.



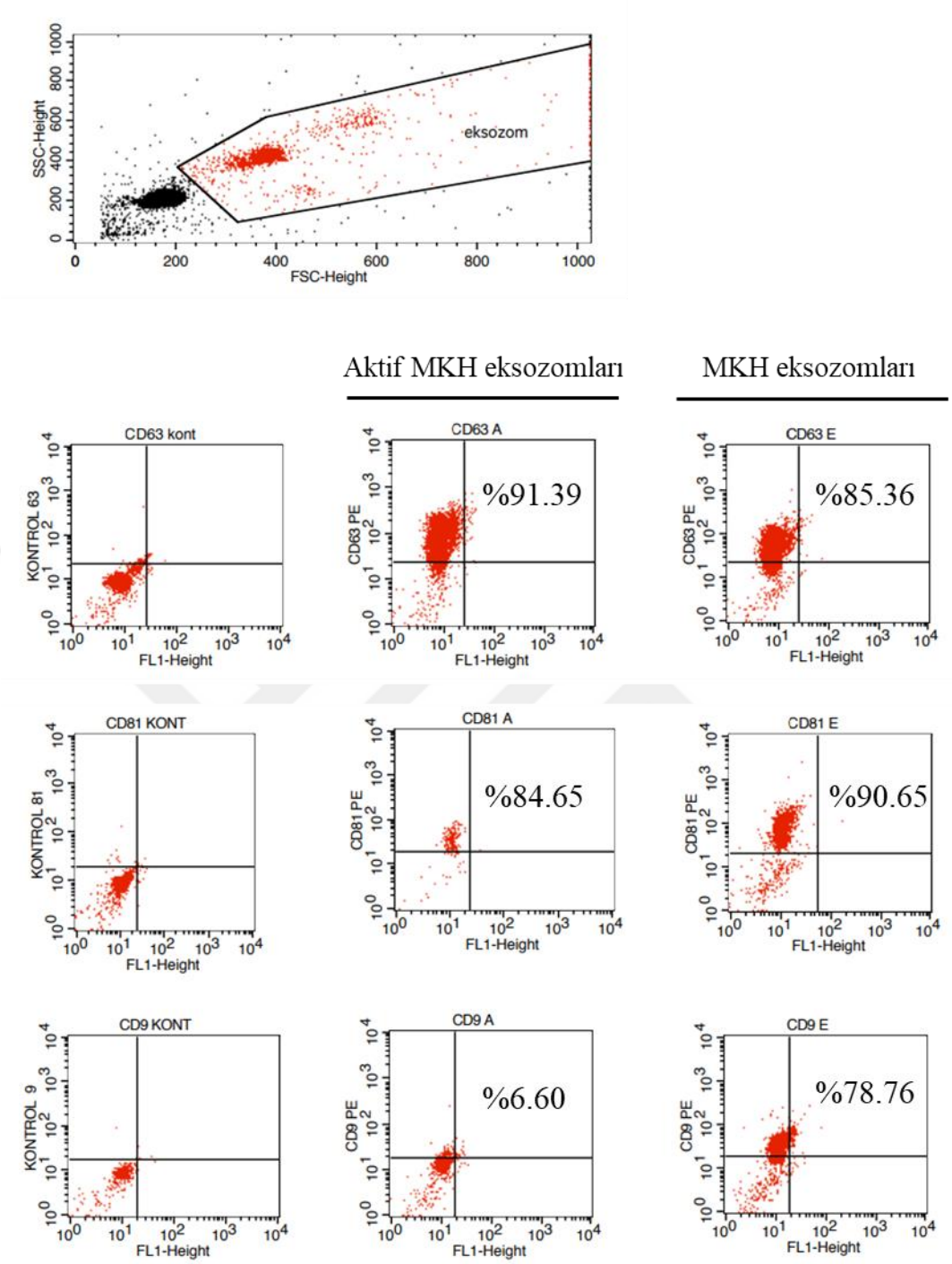
Şekil 4. 2. MKH'lere ait akım sitometri analizleri. Akış sitometri analizi, CD44, CD29, CD73, CD90, CD105 ve CD13 için %98,35, %99,36, %97,64, %99,50, 83,30 ve %95,88 pozitifliği ortaya çıkardı. Bu arada, CD15, CD45 ve CD34 için sırasıyla %0,41, %0,43 ve %1,68 negatifti.

4.2. iWJ-MKH türevli eksozomların eldesi ve karakterizasyonu

iWJ-MKH, 3-10 pasaj arasında eksozom izolasyonu için kullanıldı ve eksozomlar ultrasantrifüjleme tekniği ile elde edildi (Şekil 4.3A). ZetaSizer analizi, PBS çözeltisindebulunan parçacıkların konsantrasyonunun, yaklaşık 100 nm'de bir zirve ile eksozom boyutları olduğunu ortaya çıkardı (Şekil 4.3B). Transmisyon elektron mikroskobu altında nispeten tek biçimli boyutta ve yuvarlak veya oval şekilli membranöz kesecikler gözlendi (Şekil 4.3C). Keseciklerin orta kısmı, çapı 50-180 nm arasında değişen düşük elektron yoğunluğu bölgesinde görülebilmektedir. Akım sitometri analizleri, yüzeye özgü pozitif işaretleyiciler olan CD9, CD63 ve CD81'in, iWJ-MKH hücrelerinden gelen eksozomlarda yüksek oranda eksprese edildiğini ortaya çıkardı (Şekil 4.4). Bütün bu sonuçlar, ekstrakte edilen vezikül benzeri malzemenin, iWJ-MKH eksozomlarının temel özellikleriyle tutarlı olduğunu gösterdi.



Şekil 4.3. iWJ-MKH-eksozomlarının izolasyonuve karakterizasyonu. (A) Diferansiyel ultrasantrifüjleme yöntemini kullanarak eksozom saflaştırmasının akış şeması. (B) Nano-Zetasizer ile izole edilmiş eksozomların parçacık boyutu dağılımı. (C) Eksozom morfolojisinin temsili TEM görüntüsü (Ölçek: 1 µm).



Şekil 4.4. Farklı içerikte elde edilen eksozomların akım sitomeri analizleri.

4.3. Histolojik ve Biyokimyasal Bulgular

4.3.1. Hematoksilen&Eozin ve PAS BoyamaBulguları

Aktif ve aktif olmayan iWJMKH'den türetilmiş eksozomların, seminifer tübül yapısında busulfan kaynaklı hasarın onarılmasındaki etkinliği genç erkek sıçanda incelenmiştir. Bu

araştırmadan elde edilen bulgular Şekil 4.3-8'de gösterilmektedir. Seminifer tübüller, deney gruplarında spermatogenezi ölçmek için ortalama Johnsen skoruna göre derecelendirildi.

Kontrol grubunun (Şekil 4.5) sıçan testisinden alınan hematoksilen ve eozin boyalı kesitlerin ışık mikroskobik incelemesinde görüldüğü gibi testis, kan damarları ve Leydig hücrelerini içeren interstisyel doku ile ayrılmış seminifer tübüllerden oluşuyordu. Seminifer tübüller çok katmanlı spermatogenik hücreler ve Sertoli hücreleriyle kaplıydı.

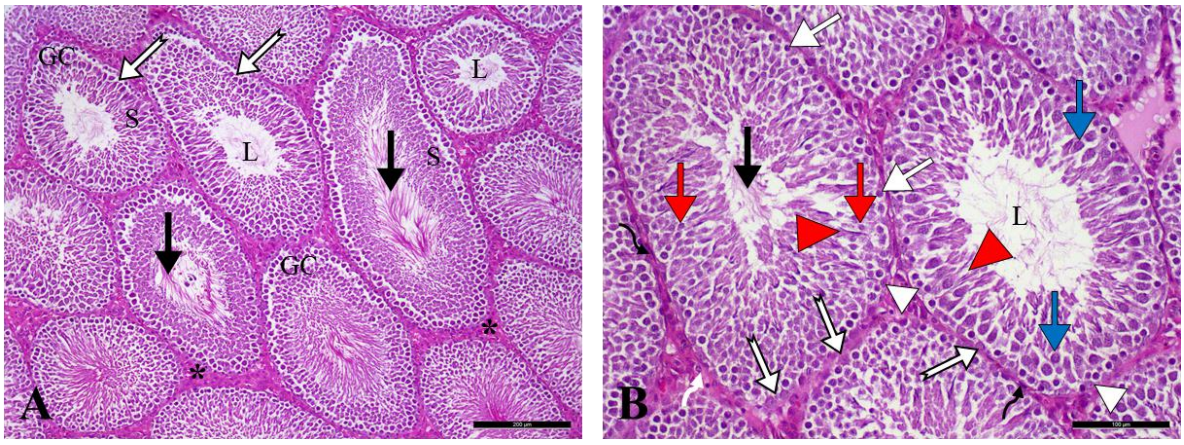
Spermatojenik hücreler; spermatogonia, primer spermatositler, spermatidler ve spermatozoa'yı içeriyordu. Spermatogonia, seminifer tübüllerin bazal membranı ile fiziksel temas halinde bulunmaktadır. Bu hücreler, sınırlı sitoplazmaya sahipti ve bazal membran üzerinde duran koyu tip A ve soluk tip A'yı içeriyordu. Koyu tip A spermatogonia'nın oval koyu nukleusları vardı ve soluk tip A spermatogonia'nın soluk oval nukleusları vardı. B tipi spermatogonyumlar pek farklılaşmadı. Primer spermatositler en büyük çekirdek boyutlarına göre ayırt edilebilen spermatojenik hücrelerdi. Yuvarlak şekilli görünüyorlardı ve karakteristik bir retiküler kromatin ağını gösteren merkezi yuvarlak veziküler nukleuslara sahiptiler. İki tür spermatid görüldü; yuvarlak soluk nukleuslara sahip yuvarlak veya erken spermatidler ve uzun koyu lekeli nukleuslara sahip uzun veya geç spermatidler. Seminifer tübüllerin çoğunun lümeninde olgun spermatozoa mevcuttu. Sertoli hücreleri, bazal membran üzerinde belirgin bir nükleolus ile soluk oval bir nukleusa sahiptir ve seminifer tübüllerin interstisyel boşluğunda asidofilik sitoplazmalı Leydig hücreleri bulunur. Myoid hücrelerin sitoplazması hafif lekelidir, peritübüler myoid hücrelerin nukleusları iğ şeklindedir ve seminifer tübülleri çevrelemişlerdir.

Busulfan grubunun testisleri, testis yapısında belirgin bir bozulma ve testis hücrelerinde belirgin dejeneratif değişiklikler ortaya çıkardı (Şekil 4.6). Seminifer tübüller arasındaki interstisyel boşluklar genişledi. Bu boşluklar aşırı miktarda homojen asidofilik malzeme ve tıkalı, kalın duvarlı kan damarları içeriyordu. Bazal membranın fokal kalınlaşması da ortaya çıkarıldı. Seminifer tübüllerin çoğu, lümenlerinde olgun spermatozoa bulunmadığından, spermatojenik hücre katmanlarında belirgin bir azalma gösterdi. Bazı spermatojenik hücrelerin yerini büyük vakuoller almıştır. Vakuollü spermatogonia ve koyu boyalı nukleuslara sahip primer spermatositler mevcuttu. Koyu boyalı nukleuslara ve derin asidofilik sitoplazmaya sahip bazı apoptotik hücreler görüldü. Bazı seminifer tübüllerde çok nukleuslu dev hücreler gözlendi. Bazı seminifer tübüller yalnızca Sertoli hücreleriyle kaplıydı. Leydig hücrelerinin çoğu, koyu lekeli küçülmüş nukleuslar ve derin asidofilik

sitoplazma ile apoptotikti. Testis ağırlık indeksi açısından, normal ve busulfan grupları arasında testis ağırlık değişimlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlendi (Şekil 4.9A) ($p<0.0001$). Kontrol grubuna göre busulfan maruziyetinde, Johnsen skorunda anlamlı bir azalma gözlendi (Şekil 4.9B) ($p<0.0001$). Aynı zamanda, kontrol ile kıyaslandığında busulfan grubunda, anlamlı bir şekilde azalan seminifer tübül çapı veepitel tabakası gözlendi (Şekil 4.9C-D, sırasıyla) ($p<0.0001$); bu, azospermi sıçan modelinin başarılı bir şekilde oluşturulduğunu göstermektedir.

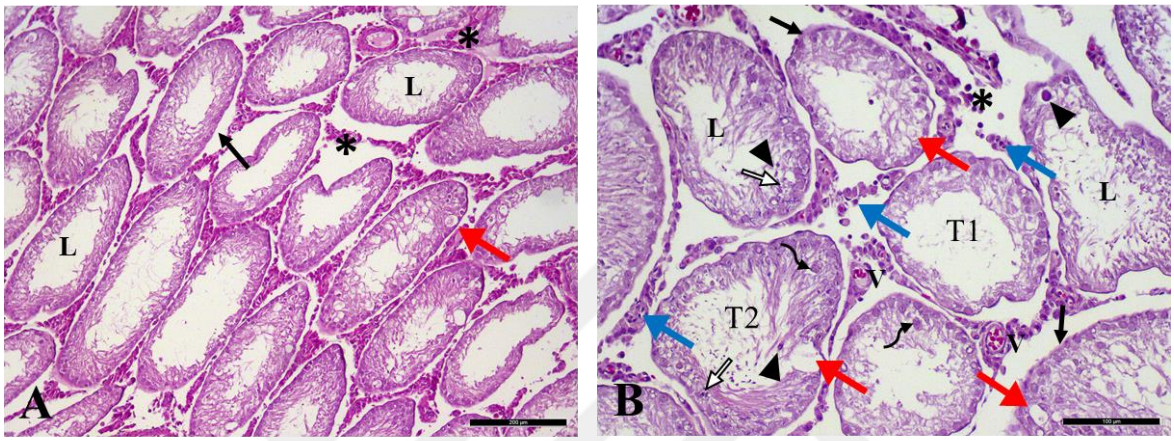
Tedavi gruplarına ait testis dokularının histolojik analizi, azospermik sıçanlara aktif ve aktif olmayan iWJ-MKH-eksozom enjeksiyonunun (80 µg/sıçan) spermatogenezi düzelttiğini gösterdi (Şekil 4.7 ve 4.8).80 µg eksozomların uygulanması, erkek infertilitesinde busulfanın neden olduğu işlev bozukluğunu iyileştirebilse de aktif iWJ-MKH eksozomları, testis ağırlık indeksi, Johnsen skoru, seminifer tübül çapı ve epitel tabakası açısından değerlendirildiğinde kısmen tam spermatogenezi indükleyerek bu anormalliklerin iyileşmesindeki en iyi etkileri gösterdiğini ortaya çıkardık; bu, aktif iWJMKH'den türetilen eksozomların, sıçan azospermi modelindeki hasarı başarıyla onardığını göstermektedir.

PAS boyaması, busulfan indüklü azospermi sıçan modelinde farklı içerikli eksozomların seminifer tübülün bazal membranı üzerindeki etkilerini ortaya çıkardı. Kontrol grubundaki PAS boyama sonuçları seminifer tübüllerin normal bazal membran bütünlüğünde olduğunu gösterdi (Şekil 4.10A). Busulfan maruziyeti sonrası seminifer tübülleri çevreleyen bazal membranın neredeyse tamamen kaybolduğu gözlenirken (Şekil 4.10B), bu bozulma her iki eksozom terapisiyle tersine çevrildi (Şekil 4.10C ve 4.10D).

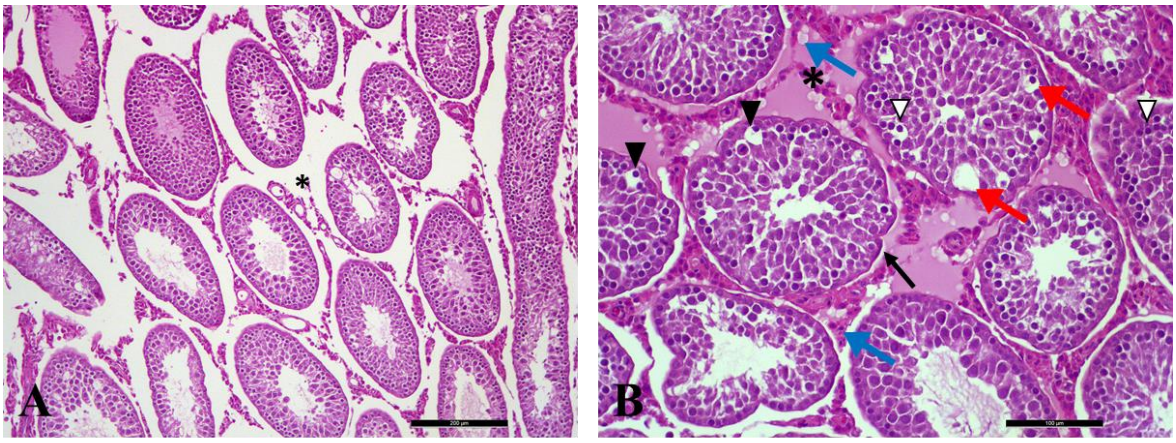


Şekil 4.5. Kontrol sıçanlarının testislerindeki parafin kesitlerinin fotomikrografları. (A) Seminifer tübüller birkaç katman spermatojenik hücreyle (çapraz beyaz oklar) kaplıdır. Bazı seminifer tübüllerin lümeninde (L)olgun spermler ve tübüller arasındaki interstisyel doku (*) gözlendi. (B) Tübüller çok katlı germinal epitel ile kaplıdır. Koyu tip A spermatogonia

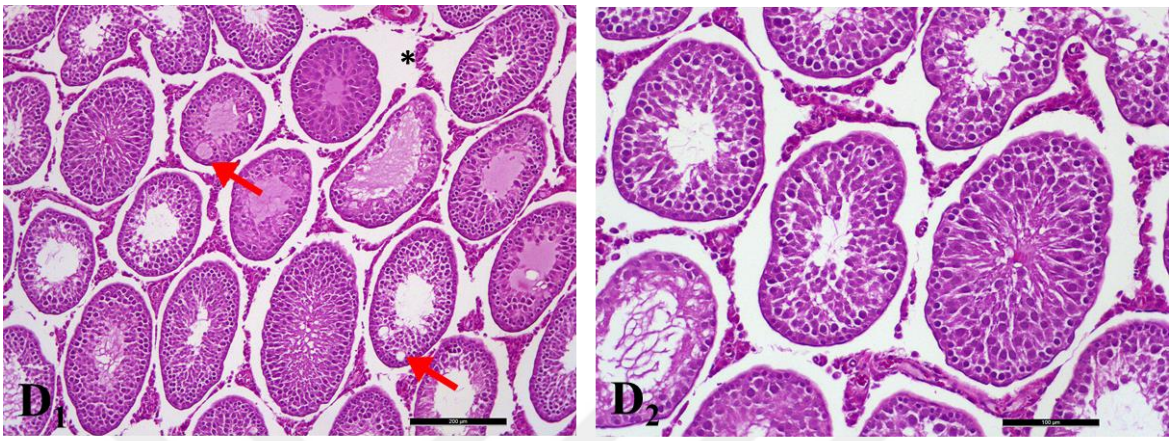
(beyaz kalın oklar), soluk tip A spermatogonia (beyaz okbaşı) bazal membran üzerinde durmaktadır. Primer spermatositler (mavi oklar), retiküler kromatin ağı ile yuvarlak çekirdeklere sahiptir. Yuvarlak spermatidler (kırmızı oklar) küçük yuvarlak çekirdeklere sahipken, uzun spermatidler (kırmızı okbaşı) uzun koyu çekirdekler gösterir. Oval soluk çekirdekli Sertoli hücreleri (beyaz dalgalı ok), bazal membranın yakınındaki spermatojenik hücreler arasında bulunur. İnterstisyel doku, yuvarlak veya oval veziküler çekirdeklere ve kan damarlarına (siyah dalgalı ok) sahip Leydig hücrelerini (beyaz dalgalı ok) içerir. H&E boyama. Ölçek: A, 200 µm ve B, 100 µm.



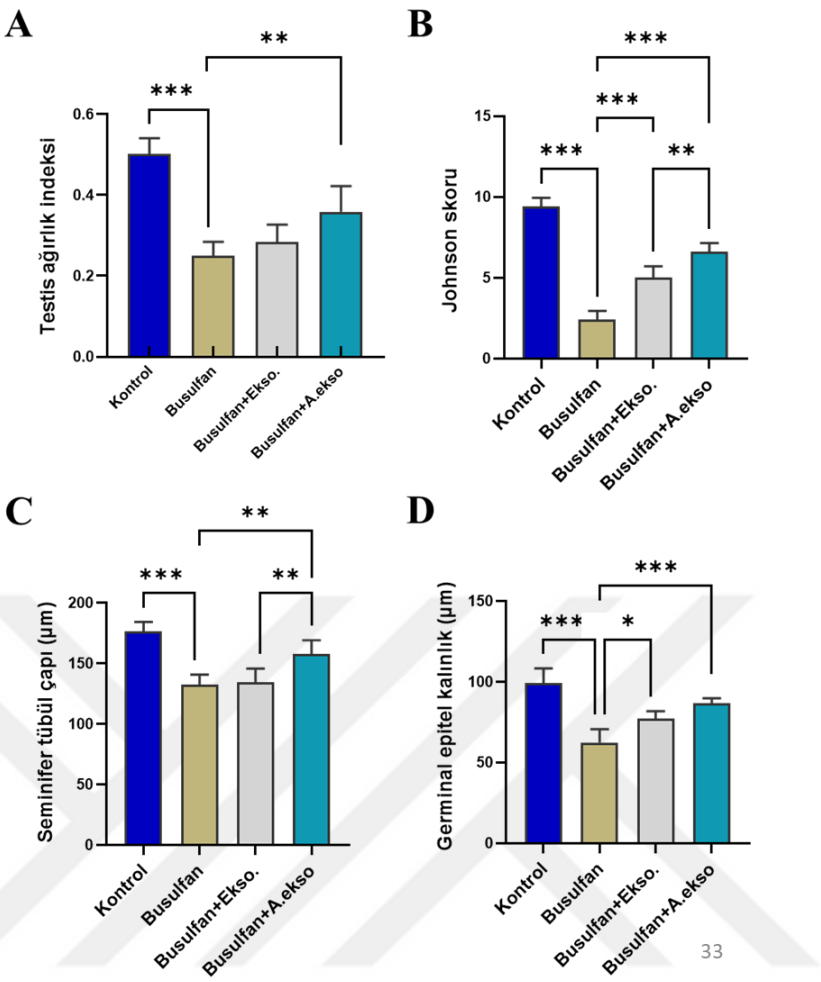
Şekil 4.6. Busulfan uygulamasından 8 hafta sonra sıçanların testislerindeki parafin kesitlerinin fotomikrografları. (A) homojen asidofilik malzeme sergileyen seminifer tübüller arasındaki interstisyel boşlukların (*) genişlediğini göstermektedir. (B) seminifer tübüllerde (L) olgun spermlerin tamamen yokluğu ile germinal epitelyumun hücreselliğinin tüm aşamalarında belirgin bir tükenme göstermektedir. Bazal membranın fokal kalınlaşması da (ince siyah ok) görülüyor. Germinal epitel hücrelerinin yerini büyük vakuoller (kırmızı oklar) alır ve çok nukleuslu dev hücreler (dalgalı siyah ok) gözlenir. Vakuollü spermatogonia ve dejenere nukleuslara sahip hücreler (ince beyaz oklar) ve apoptotik cisimcikler (siyah okbaşları) da görülmektedir. İntertisyel alanda kalın duvarlı kan damarları (V) ve piknotik nukleuslara sahip Leydig hücreleri (mavi oklar) görülmektedir. T1, yalnızca Sertoli hücreleriyle kaplı, T2 ise Sertoli hücreleri ve birkaç spermatojenik hücre ile kaplıseminifer tübüllleri ifade eder. H&E boyama. Ölçek: A, 200 µm ve B, 100 µm.



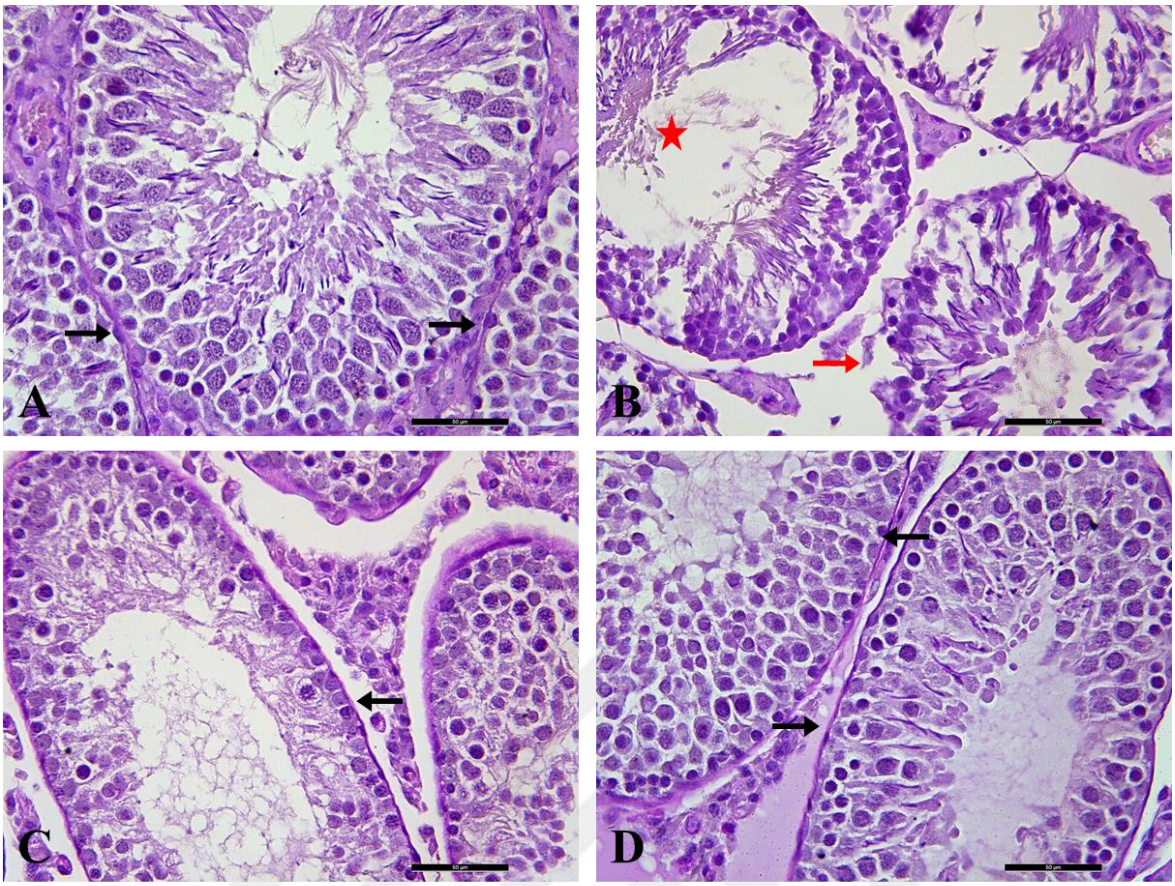
Şekil 4.7. Busulfan uygulamasından 5 hafta sonrasıçanların testislerine aktif olmayan iWJ-MKH eksozomları uygulanan parafin kesitlerinin fotomikrografları. Aktif olmayan iWJ-MKH eksozom grubu, homojen asidofilik maddeye (*) sahip geniş interstisyel dokuyu ve koyu lekeli küçültülmüş nukleuslara ve büyük vakuollere sahip Leydig hücrelerini (mavi oklar) gösterir. Vakuollü spermatogonia (ok başı) ve koyu boyalı nukleuslara sahip primer spermatositler (beyaz ok başı) gözlenir.H&E boyama. Ölçek: A, 200 µm ve B, 100 µm.



Şekil 4.8. Busulfan uygulamasından 5 hafta sonrasıçanların testislerine aktif iWJ-MKH eksozomları uygulanan parafin kesitlerinin fotomikrografları. Aktif eksozom tedavisi sonrasında testislerin histolojisinde belirgin bir patolojik değişiklik ve yapısal kusur yoktu. Zaman zaman germinal epitelin vakuollü hücreleri (kırmızı ok) ve dağınık interstisyel boşluklar (*) gözlendi.H&E boyama. Ölçek: A, 200 µm ve B, 100 µm.



Şekil 4.9. Tüm gruplara ait sıçan testis ağırlık indeksi (A) ve Johnson skoru (B), seminifer tübül çapı (C) ve germinal epitel kalınlık (D) ölçümlerini içeren histomorfometrik parametreler. ***: $p < 0.001$ and **: $p < 0.01$ ve *: $p < 0.05$.



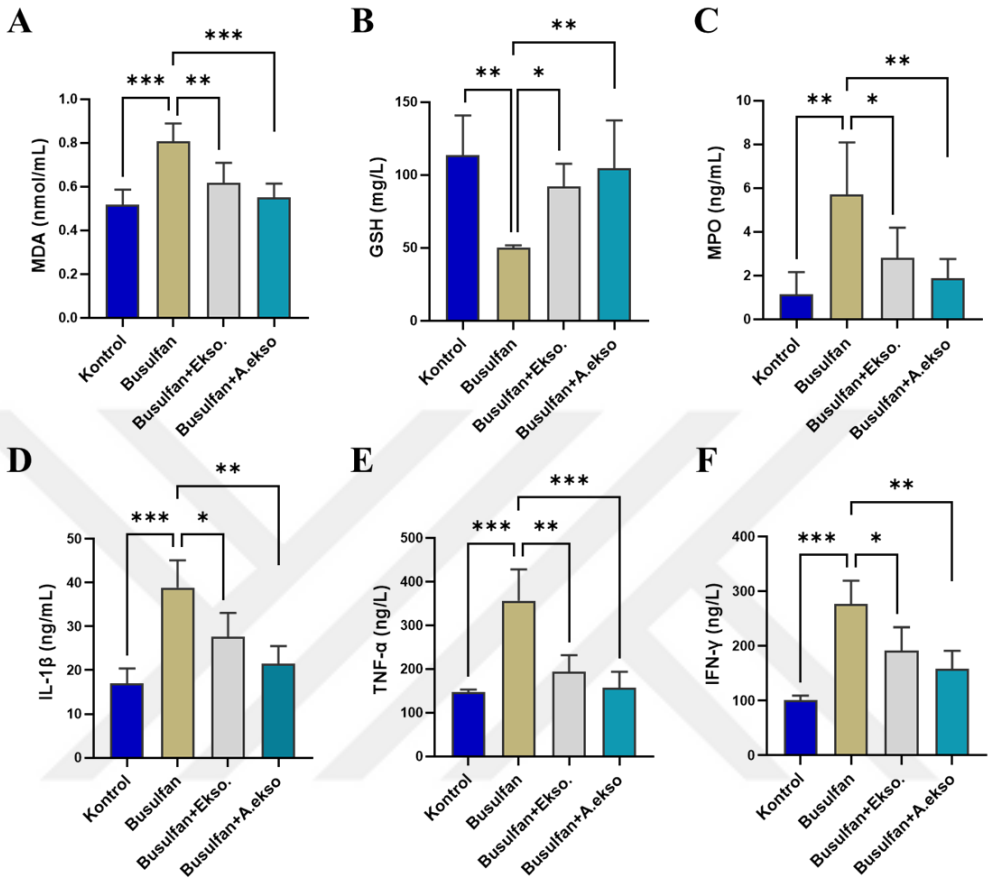
Şekil 4.10. Tüm gruplara ait PAS boyaması fotomikrografları. A: Kontrol grubu, B: Busulfan grubu, C: Aktif olmayan iWJ-MKH eksozom grubu, D: Aktif iWJ-MKH eksozom grubu. Kırmızı yıldızlar: hasarlı spermatojenik tübüller, siyah ok: bazal membran. Ölçek: 50 µm.

4.3.2. Biyokimyasal Analiz Bulguları

Busulfan'a maruz bırakılan sıçanlarda, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında testis dokusunda MDA seviyelerinde, MPO aktivitesinde önemli bir artış ve GSH'de önemli bir azalma gözlendi (Şekil 4.11A, B ve C) (***: $p<0,001$, **: $p<0,01$ ve **: $p<0,01$, sırasıyla). Öte yandan, iWJ-MKH eksozomlarının sıçanlara uygulanması ile artan GSH seviyesi ve azalan MDA seviyesi ve MPO aktivitesi gözlenmiştir. Busulfan grubu ile karşılaştırıldığında aktif iWJ-MKH eksozomlarında daha fazla anlamlı bir fark olduğu gözlendi.

Busulfan'a maruz bırakılan sıçanlarda, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında pro-inflamatuar sitokin olan IL-1β, TNF-α ve INF-γ düzeylerinde anlamlı bir artış görüldü ($p<0.001$, $p<0.001$ ve $p<0.0001$, sırasıyla) (Şekil 4.11D, E ve F). Öte yandan iWJ-MKH eksozomların sıçanlara uygulanması, pro-inflamatuar sitokin ekspresyonunu bulsufan grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde azaltmıştır ($p<0.05$, $p<0.01$ ve $p<0.05$,

sırasıyla). Busulfan grubu ile karşılaştırıldığında, aktif iWJ-MKH eksozomları, bu proinflamatuar moleküller üzerinde aktif olmayan eksozomlara göre daha fazla iyileştirici etki gösterdi ($p<0.01$, $p<0.001$ ve $p<0.01$, sırasıyla).



Şekil 4. 11. Deney süresinin sonunda farklı deney gruplarına ait testis dokularında MDA, GSH seviyeleri ve MPO aktiviteleri ve serumlarında IL-1β, TNF-α ve IFN-γ seviyeleri. A. Malondialdehit (MDA) ve B. Glutatyon (GSH) seviyeleri. C. Miyeloperoksidaz (MPO) aktivitesi. D. İnterlökin-1 beta (IL-1β) düzeyi. E. Tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-α) düzeyi. F. İnterferon-gamma (INF-γ) seviyesi. ***: $p < 0,001$ ve **: $p < 0,01$ ve *: $p < 0,05$.

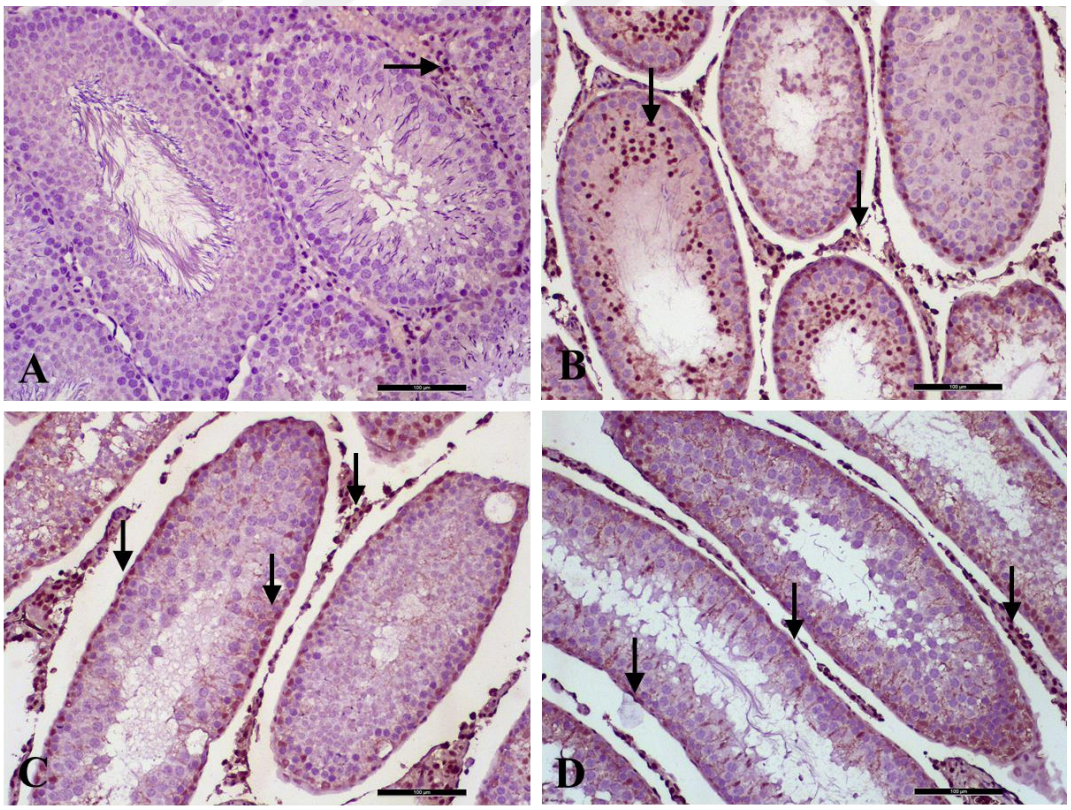
4.3.3. İmmünohistokimyasal Analiz Bulguları

Kontrol grubunun sıçan testislerinden aktif kaspaz-3 boyama sonrası ışık mikroskobik incelemesi (Şekil 4.12A), spermatojenik epitelyumun sitoplazmasında ve nukleusunda negatif ila zayıf kaspaz-3 immün ekspresyonu gösterdi. Bununla birlikte, busulfan tedavisinden 8 hafta sonra (Şekil 4.12B) sıçan testisi, birçok spermatojenik hücrenin hem sitoplazmasında hem de nukleusunda pozitif kaspaz-3 immün ekspresyonu gösterdi. Busulfandan sonra aktif olmayan ve aktif iWJ-MKH eksozom tedavisi (sırasıyla Şekil 4.12C ve 4.12D) sıçan testisleri, birkaç spermatojenik hücrede pozitif kaspaz-3 immün

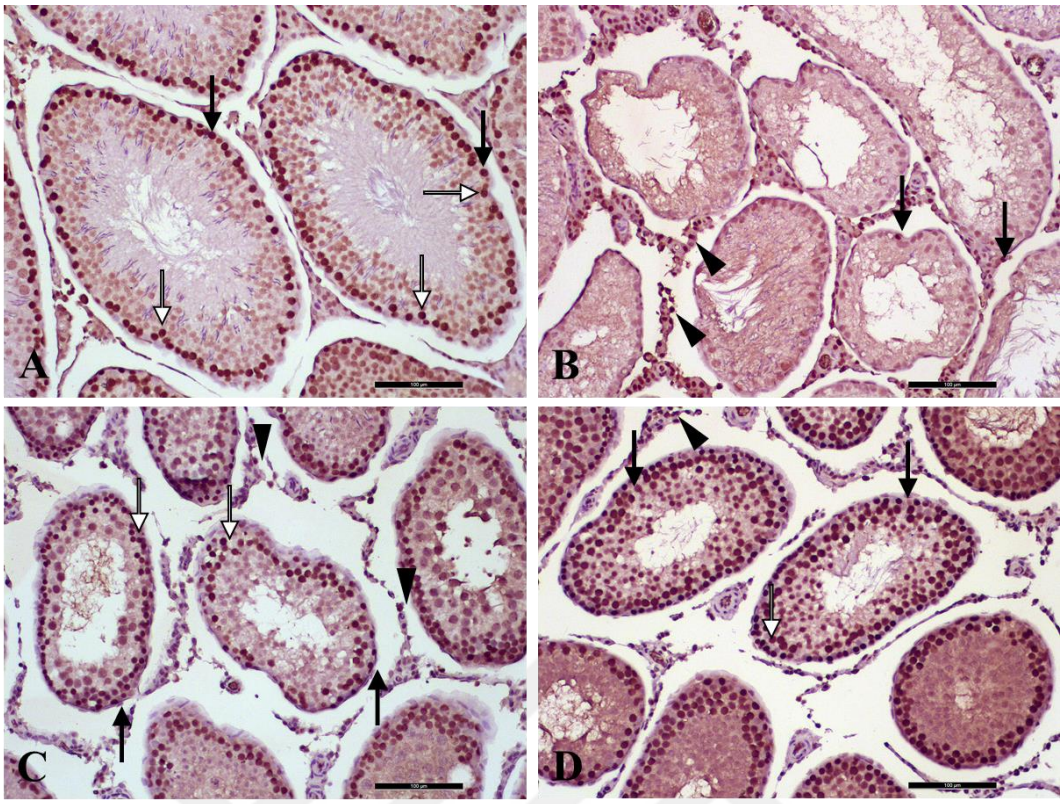
ekspresyonu gösterdi. Aktif iWJ-MKH eksozom tedavisinde buprotein ekspresyonu, aktif olmayan gruba göre daha azdı.

Kontrol grubunun sıçan testislerinden PCNA ile boyanmış kesitlerin ışık mikroskobik incelemesi, spermatogoniada çok sayıda pozitif PCNA-immünoreaktif nukleus, seminifer tübüllerin primer spermatositleri ve interstisyel dokudaki bazı hücreleri gösterdi (Şekil 4.13A). Busulfan tedavisinden 8 hafta sonra (Şekil 4.13B), spermatojenik hücrelerde ve interstisyel dokuda az sayıda pozitif PCNA-immünoreaktif nukleus tespit edildi. Öte yandan, busulfandan sonra aktif olmayan ve aktif iWJ-MKH eksozom tedavisi (Şekil 4.13C ve 4.13D, sırasıyla) sıçan testislerinde spermatogoniada ve bazı seminifer tübüllerin primer spermatositlerinde birçok pozitif PCNA-immünoreaktif nukleus görüldü. İnterstisyel dokudaki bazı hücreler de pozitif reaksiyon gösterdi.

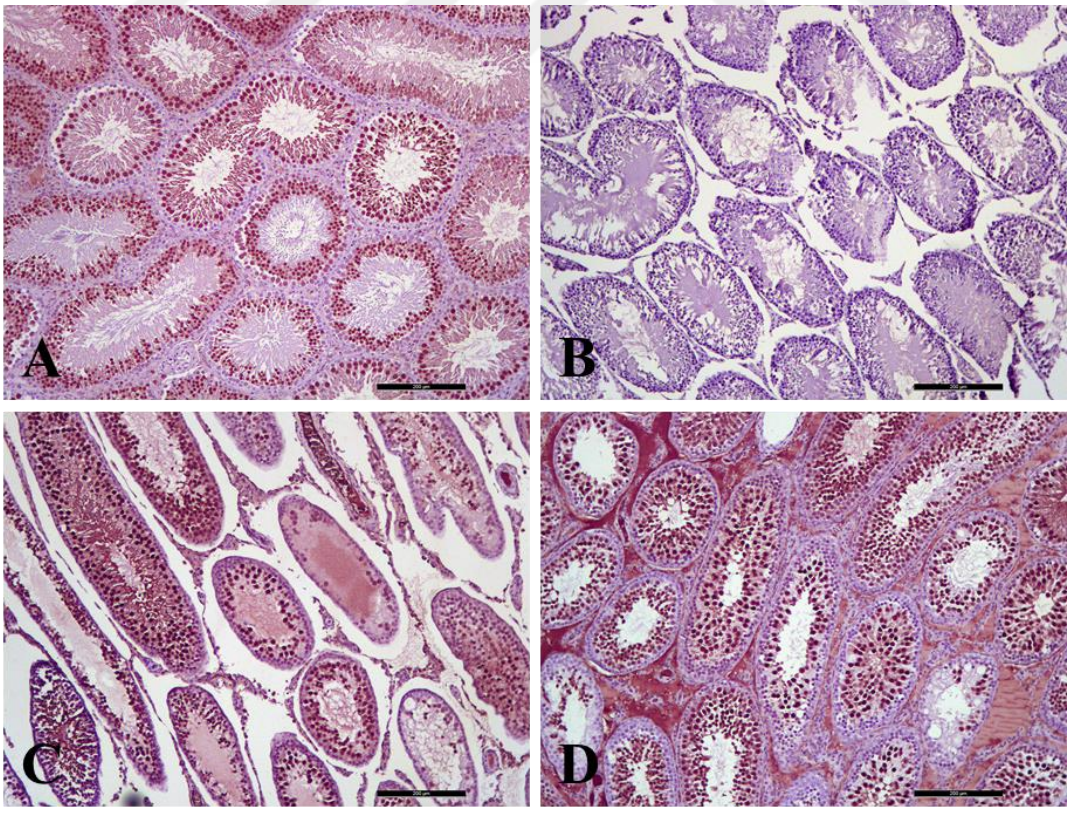
Germ hücrelerine özgü genlerin (Piwil, Ddx4 ve Dazl) protein seviyeleri, busulfan grubunda açıkça daha düşük bir seviyeye kadar bastırıldı (Şekil 14, 15 ve 16), ancak iWJ-MKH eksozomlarının transferinden 3 hafta sonra yaklaşık olarak normal seviyelere geri döndüler.



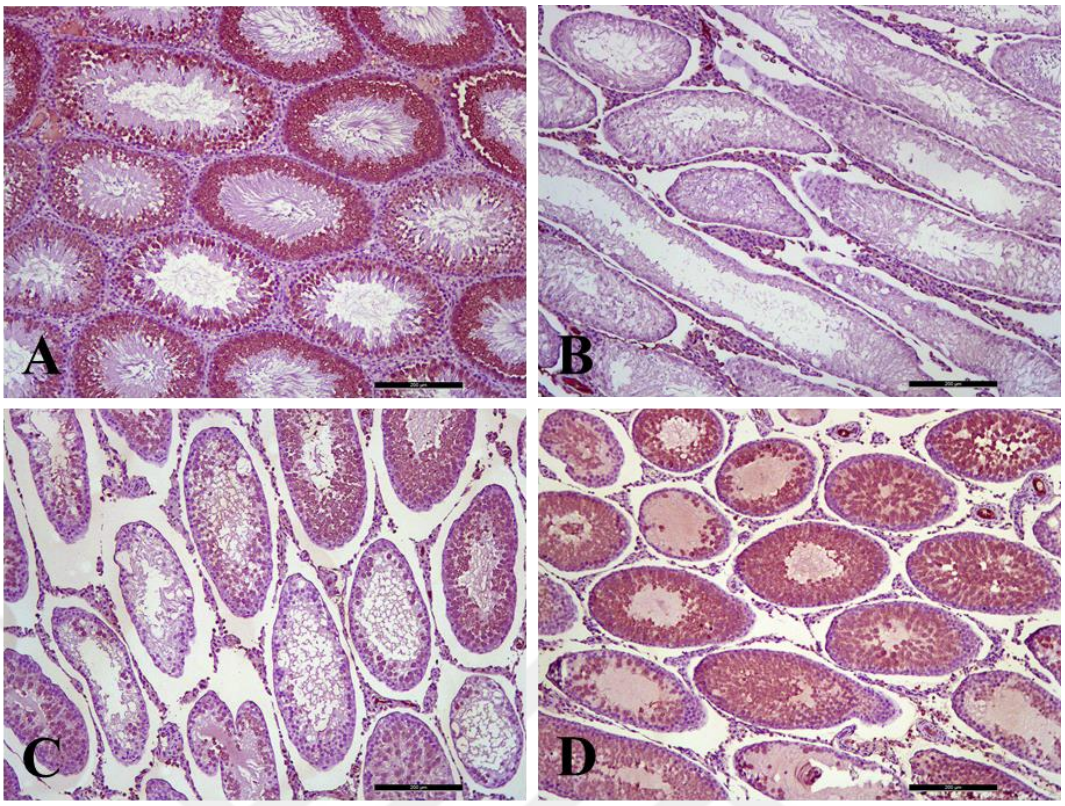
Şekil 4. 12. Deney grupları arasında aktif Kaspaz-3 ekspresyonları. A: Kontrol, B: Busulfan, C. iWJ-MKH-ekso., D: aktif iWJ-MKH-ekso. grupları. Ölçek: 100 µm.



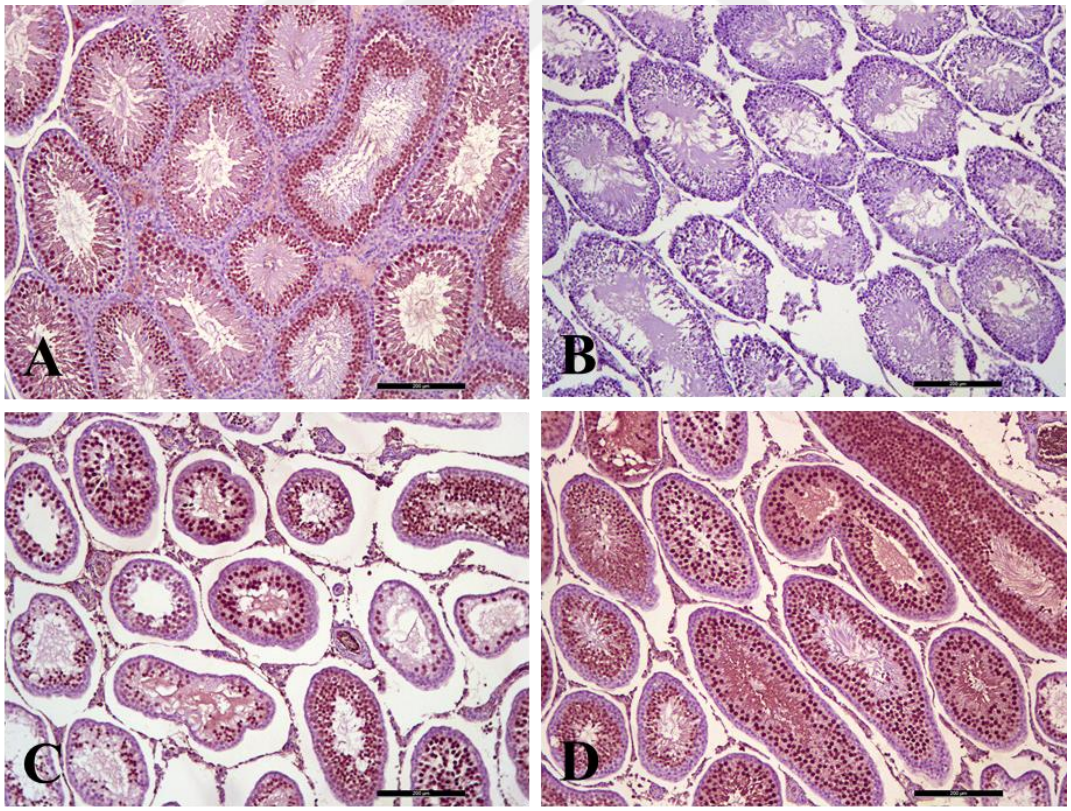
Şekil 4. 13. Deney grupları arasında PCNA ekspresyonları. A: Kontrol, B: Busulfan, C. iWJ-MKH-ekso., D: aktif iWJ-MKH-ekso. grupları. Ölçek: 100 µm.



Şekil 4. 14. Deney grupları arasında PİWİL ekspresyonları. A: Kontrol, B: Busulfan, C. iWJ-MKH-ekso., D: aktif iWJ-MKH-ekso. grupları. Ölçek: 100 µm.



Şekil 4. 15. Deney grupları arasında DDX4 ekspresyonları. A: Kontrol, B: Busulfan, C. iWJ-MKH-ekso., D: aktif iWJ-MKH-ekso. grupları. Ölçek: 100 µm.



Şekil 4. 16. Deney grupları arasında DAZL ekspresyonları. A: Kontrol, B: Busulfan, C. iWJ-MKH-ekso., D: aktif iWJ-MKH-ekso. grupları. Ölçek: 100 µm.

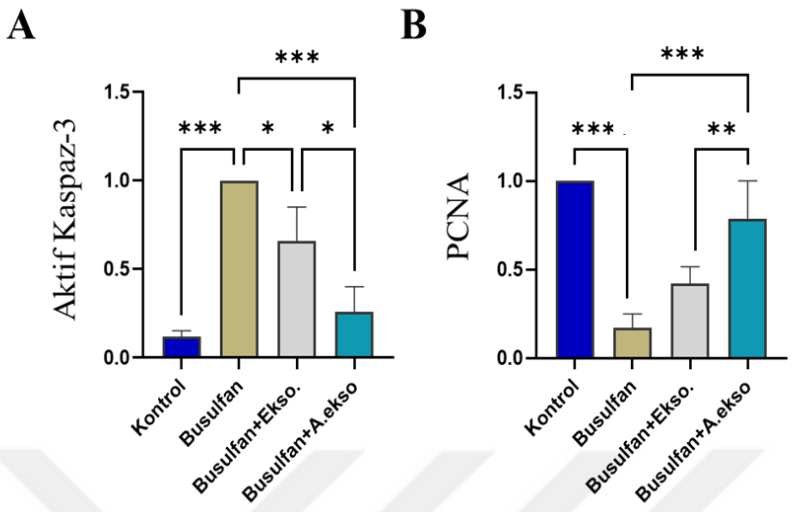
4.3.4. Western Blot Analiz Bulguları

Hücre proliferasyonu ve apoptoz dengesizliğinin spermatogenez fonksiyon bozukluğunu etkileyen anormal homeostazise katkıda bulunduğu kanıtlanmıştır (Muratori et al., 2015). Western blot analizi, kontrol, hasar ve tedavi gruplarında hücre çoğalma belirteci PCNA yönelik sinyal ile hücre apoptoz belirteci aktif kaspaz-3'e yönelik sinyalin oranını değerlendirmek için kurulmuştur. Sonuçlar, aktif kaspaz-3 oranının busulfan grubunda kontrol hayvanlarına kıyasla açıkça arttığını ($p<0.0001$) ve busulfan grubuyla kıyaslandığında aktif iWJ-MKH eksozomları ile tedavinin aktif kaspaz-3 ekspresyonunun açıkça bastırıldığını gösterdi ($p<0.001$) (Şekil 4.17A). Aktif olmayan eksozom terapisiyle kıyaslandığında, aktif eksozomların apoptozu inhibe etme özelliğinin daha fazla olduğunu ortaya çıkardık ($p<0.05$). Apoptoz sonuçlarının aksine, busulfsan grubunda PCNA oranı anlamlı derecede azaldı ($p<0.0001$), ancak bu oran busulfan-A.ekso grubu ile kontrol grubu arasında benzerdi (Şekil 4.17B). Bununla birlikte, busulfan sonucu oluşan apoptoz ve hücre proliferasyonu arasındaki dengesizlik, busulfan+ekso grubu ile karşılaştırıldığında busulfan+A.ekso grubunda açıkça daha iyi düzelme gösterdi.

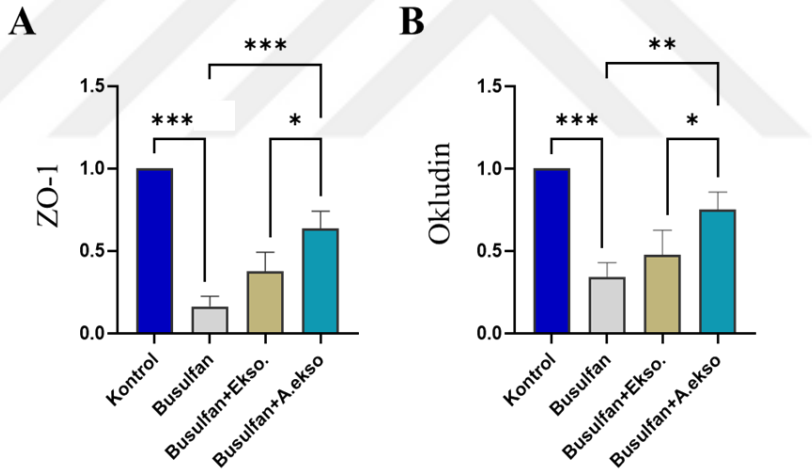
Bu çalışmada okludin ve ZO-1'i içeren tipik hücre yapışması ve bağlantıyla ilişkili proteinlerin ekspresyonunu araştırdık. Sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında, busulfan grubunda ZO-1 ve okludin protein ekspresyonlarında şiddetli düşüş görüldü ($p<0.0001$ ve $p<0.001$, sırasıyla) (Şekil 4.18A ve 4.18B). Aktif iWJ-MKH-eksozom uygulanmasından sonra bu protein seviyelerinin aktif olmayan eksozom ile karşılaştırıldığında açıkça daha fazla arttığı gözlendi ($p<0.001$ ve $p<.0.01$). Busulfan ve busulfan+ekso grupları arasında anlamlılık gözlenmedi.

Çalışmamızda, 8 haftalık busulfan maruziyeti sonrasında testiste mayozla ilişkili protein (Piwil, Ddx4 ve Dazl) ekspresyonlarında inhibisyon gözlendi ($p<0.0001$); bu da mayoz bölünmenin durdurulduğunu gösterir (Şekil 4.19A, 4.19B ve 4.19C). Mayozla ilişkili genlerin artan ekspresyonunu içeren mayotik öncesi ve mayotik sürecin yeniden aktivasyonu, azospermik hayvanlara aktif ve aktif olmayan eksozom uygulamasından sonra spermatogenik sürecin erken iyileşmesini gösterir. Bu iyileşme busulfan+ekso grubu ile karşılaştırıldığında, busulfan+A.ekso grubunda daha fazla gözlendi ($p<0.05$, $p<0.05$ ve $p<0.01$, sırasıyla). Kısa vadede MKH salgısının spermatogenezin normal gelişiminde rol oynayabileceği ileri sürülebilir Piwil, Ddx4 ve Dazl'nin Western blot sonuçları, MKH'den

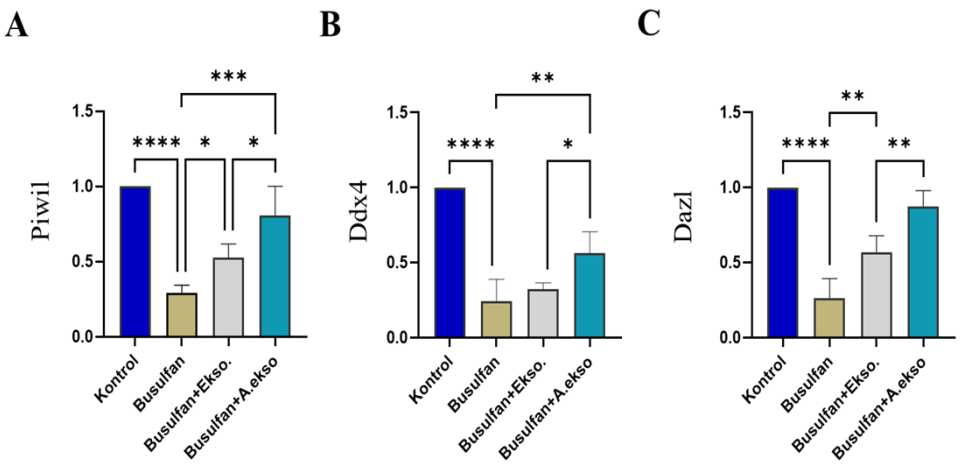
türetilen faktörlerin spermatogenezin hızlandırılması üzerindeki etkilerini göstererek IHC sonuçlarını desteklemiştir.



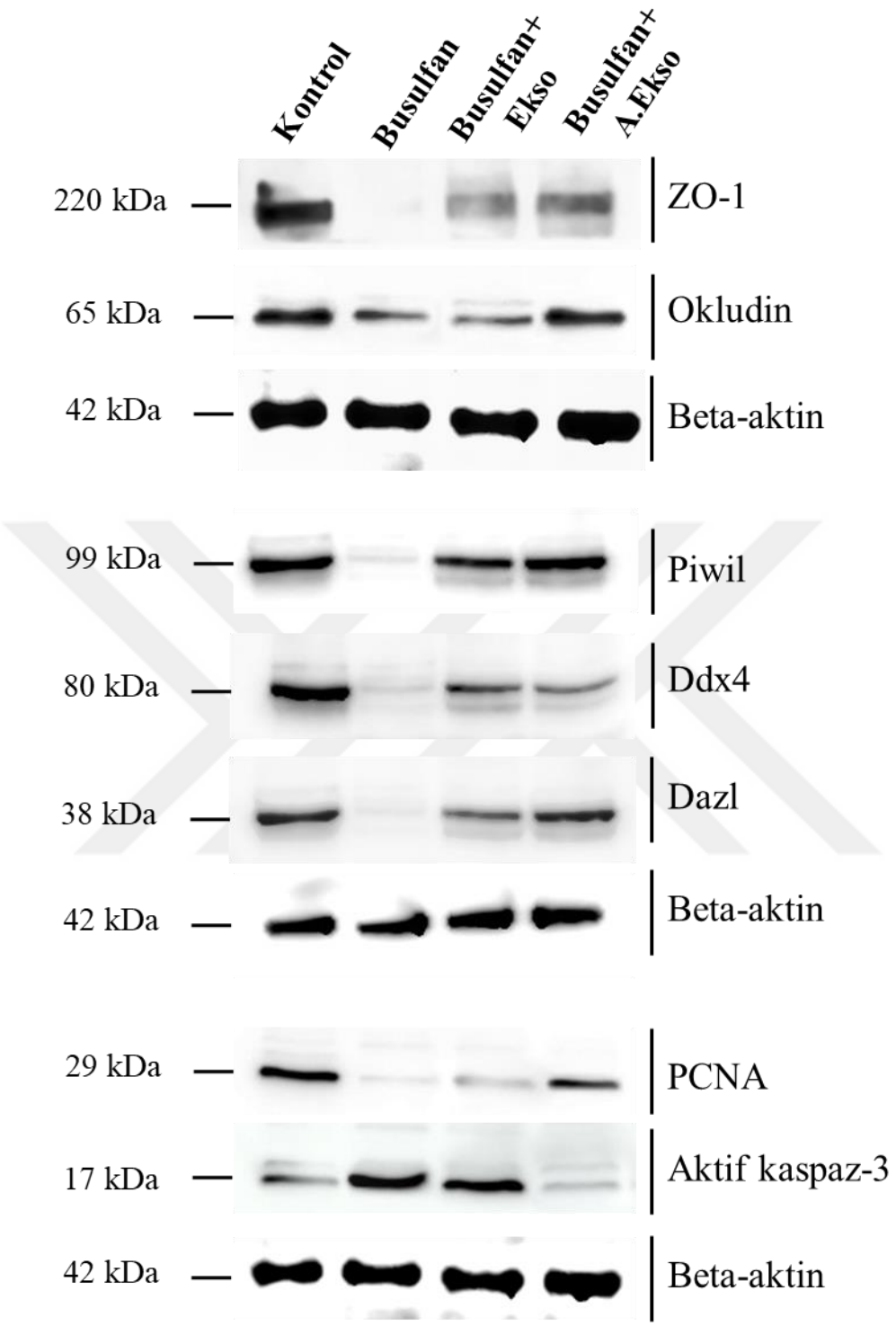
Şekil 4. 17. Deney grupları arasında aktif Kaspaz-3 ve PCNA protein ekspresyonu seviyelerinin gösterilmesi. ***: p < 0,001, **: p < 0,01, *:p < 0,05.



Şekil 4. 18. Deney grupları arasında ZO-1 ve okludin protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi. ***: p < 0,001, **: p < 0,01, *:p < 0,05.



Şekil 4. 19. Deney grupları arasında Piwil, Ddx4 ve Dazl protein ekspresyonu seviyesinin gösterilmesi. ***: $p < 0,001$, **: $p < 0,01$, *:$p < 0,05$.



Şekil 4. 20. Zo-1, Okludin, Piwil, Ddx4, Dazl, PCNA, Aktif kaspaz-3 ve β-aktin protein miktarlarının gösterilmesi ve gruplara ait bandlar görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Kanser tedavilerinin gelişmesiyle birlikte yüksek sağkalım oranlarına ulaşılırken, gonadotoksisite tedavisi alan ergenlik öncesi ve sonrası hastalar infertilite ile karşı karşıya kalabilmektedir. Ancak Siklofosfamid ve Busulfan gibi kemoterapi alan çocukların %50'den fazlasında erişkinlik döneminde azospermi ve oligospermi geliştiği bildirilmektedir (Green ve ark., 2014). Yardımla üreme tekniklerindeki gelişmeler, özellikle de 1992'de intrasitoplazmik sperm enjeksiyonunun ortaya çıkışı, erkek infertilitesinin birçok nedeniyle pek çok umutsuz, infertil çiftin ebeveynliği gerçekleştirmesine olanak tanır. Ancak bu teknolojiler babadan gelen potansiyel genetik anormallikleri aktarabilir ve bu stratejiler spermatogenik yetmezliği olan yetişkin erkekler ve ergenlik öncesi erkek çocuklar için uygun değildir.

Birçok çalışma kemoterapötik ajanların normal hücre ve dokulara olan toksisitesini azaltarak üreme sağlığı üzerindeki olumsuz etkilerini en aza indirmeyi amaçlamaktadır. Kemoterapi gören hastalarda üreme koruyucu ajanların kullanılması doğurganlığın ve üreme sağlığının korunmasında etkili bir önlem olabilir. Çoğu hücre tarafından salgılanan eksozomlar, hücreler arası iletişim ve malzeme değişiminde önemli bir rol oynayan, lipit çift katmanlı yapıya sahip küçük hücre dışı keseciklerdir (Jeppesen ve ark., 2019). Hücreye özgü proteinler ve fonksiyonel küçük RNA'lar gibi çeşitli biyolojik olarak aktif moleküller içerirler. Eksozomlar, hedef hücrelerin antijen sunumu, tümör büyümesi, bağışıklık tepkisi, doku onarımı ve rejenerasyonu ve hastalığın ilerlemesi gibi fizyolojik fonksiyonlarına aracılık eder (Mathieu ve ark., 2019). Eksozomların lipit çift katmanlı yapısı, kapsülledikleri maddeler için koruyucu bir ortam sağlayarak bunların hedef hücre veya dokulara taşınmasına ve iletilmesine olanak tanır. Ek olarak eksozomlardaki spesifik belirteçler hücre durumunun belirlenmesi, hastalık tanısı ve hedefe yönelik ilaç dağıtımı için kullanılabilir. Son çalışmalar, eksozomların birçok hastalık için terapötik bir araç olarak büyük potansiyele sahip olduğunu göstermiştir (Riazifar ve ark., 2019, Zhankina ve ark., 2021). Ayrıca eksozomlar, terapötik genleri hedef hücre ve dokulara ileten gen terapisi için bir araç olarak kullanılabilir. Eksozomların avantajlarından biri, biyolojik aktivitelerini etkilemeden uzun süreli depolamaya izin veren stabiliteleridir. Genel olarak, eksozomların çok yönlülüğü ve

erişilebilirliği, onları umut verici bir araştırma alanı ve çeşitli hastalıklar için potansiyel bir tedavi aracı haline getiriyor.

Wharton jeli-MKH'lerin benzersiz özellikleri, rejeneratif tıp için alternatif bir kök hücre kaynağı olarak bilim camiasının dikkatini çekmektedir. Embriyonik kök hücrelerin aksine, WJ-MKH'lerin klinik uygulamasıyla ilgili hiçbir etik kaygı yoktur. Dikkat çekici bir şekilde, her iki hücre tipi de genetik profil oluşturma çalışmalarından da anlaşılacağı üzere karşılaştırılabilir moleküler mekanizmalara sahiptir (Hsieh ve ark., 2010). Aynı zamanda, göbek kordon kanı MKH'leri WJ-MKH'lerle benzer özelliklere sahiptir, ancak düşük frekansları, zayıf proliferasyon oranları ve kültür sınırlamaları nedeniyle klinik uygulama için daha az çekicidirler (Zeddou ve ark., 2010). WJ-MKH'lerin özellikleri, onları klinik kullanım için daha iyi bir alternatif olarak nitelendiriyor çünkü WJ-MKH'ler, invazif olmayan ve ağrısız bir prosedür kullanılarak göbek kordonu dokusunun jelatinimsi tabakasından izole ediliyor. Ayrıca göbek kordonunun tıbbi atık olarak kabul edilmesi, kullanımlarıyla ilgili etik kaygıları ortadan kaldırmaktadır (Kim ve ark., 2013). Böylece, WJ-MKH'lerin kullanımı, invaziv toplama prosedürleri ve uygun hücre donörlerinin mevcudiyeti gibi yetişkin MKH'lerle ilişkili klinik sınırlamaların üstesinden gelir (Ali ve ark., 2015). WJ-MKH'lerin embriyonik doğasından dolayı, pluripotensi belirteçleri NANOG, Oct 3/4 ve Sox2'nin ifadesi yetişkin MKH'lerinkinden daha yüksektir (Nekanti ve ark., 2010; Higuchi ve ark., 2012), ve ayrıca çevresel toksinlere daha az maruz kalma ve ilişkili genetik modülasyon anlamına gelir; bu da kısmen yetişkin MKH'lere göre üstünlüklerini açıklayabilir. Yetişkin MKH'lerle karşılaştırıldığında WJ-MKH'ler daha yüksek çoğalma oranına, uzun ömürlülüğe, farklılaşma potansiyeline, bağışıklık ayrıcalığına ve daha düşük immünojenisite özelliklerine sahiptir (Kim ve ark., 2019). Bu avantajlar, WJ-MKH'lerin rejeneratif tıpta terapötik ajanlar olarak kullanılmasına olanak sağlar.

Bildiğimiz kadarıyla aktif iWJ-MKH-eksozomlarının spermatogenez üzerine etkilerini araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bu nedenle, iWJ-MKH-eksozomlarının varsayılan onarıcı etkileri göz önüne alındığında, mevcut deneyde busulfan aracılı geri dönüşümlü NOA modelinde iWJ-MKH-eksozomlarının yenileyici potansiyelini inceledik. Aynı zamanda, **çalışmamızda**, busulfan-indüklü testiküler hasarda, iWJ-MKH'lerin TNF-α, IL-1β ve IFN-γ ile önceden aktivasyonunun, trofik faktörlerin etkinliğini önemli ölçüde arttırdığını, aktive edilmemiş MKH-eksozom etkinliğininise tedavi amaçlı kullanım için çok daha az olduğunu gösterdik; bu eksozom izolasyonundan önce MKH'lerin inflamatuar koşullar altında önceden aktivasyonunun önemini ortaya koymaktadır.

Busulfan (1,4-butandiol dimetilsülfonik asit), spermatogenezi güçlü bir şekilde etkileyen ve erkek infertilitesine neden olan güçlü bir alkilleyici ajandır (Yue ve ark., 2024). Busulfan, öncelikle hücre döngüsünün G0 ve G1 fazları sırasında aktif olan, hücre döngüsüne özgü bir farmasötik ajandır. Bu aşamada hücre nukleusundaki guanin'e bağlanarak alkilleyici bir ajan olarak işlev görür ve böylece DNA'nın yapısını ve işlevselliğini bozar. Busulfanın sitotoksisitesinin kemirgenlerde spermatojenik hücrelerin mayotik sürecini engellediği gösterilmiştir. Bu işlem, metansülfonik asit iyonlarına bitişik karbon atomlarının guaninin nitrojen atomları tarafından saldırıya uğradığı, hücrenin kendisi tarafından onarılamayan DNA hasarına yol açan ve sonuçta apoptoza yol açan bimoleküler bir nükleofilik ikame reaksiyonu yoluyla gerçekleşir.

Mevcut çalışmada, busulfan tarafından azosperminin indüklendiği ve farklılaşan germ hücrelerinin tüm serilerinin dikkate değer kaybıyla, bunların yerini büyük vakuoller ve eozinofilik materyallerin aldığı gözlenmiştir. Bu konu, busulfanın neden olduğu azospermi üzerine daha önce yapılan birkaç çalışmayla uyumluydu (Zhankina ve ark., 2021). Dahası, görünüşte korunmuş az sayıdaki spermatogonia ve spermatosit, koyu lekeli nukleuslarla ortaya çıktı. Nükleer kararma hücresel apoptotik değişikliklerin bir işaretidir (Yue ve ark., 2024). Busulfanın apoptoza neden olduğu ve guaninin N7 ve O6'sının ve adeninin N3'ünün alkilasyonu yoluyla DNA'yı tahrip ettiği, zincir içi çapraz bağlantılar oluşturduğu ve bunu takiben p53 ekspresyonunda bir artışa yol açarak apoptozun içsel yolunun indüklenmesine yol açtığı bilinmektedir (Abd El-Hay ve ark., 2023). Apoptozun dışsal yolu da germ hücrelerinde busulfanın indüklediği Fas reseptörlerinin ekspresyonu yoluyla aktive edilir (İbrahim ve ark., 2021). Apoptotik germ hücrelerinin artan fagositoz hızı, büyük boyutlu lizozomlara sahip Sertoli hücrelerinin görünümünü açıklamaktadır. Işık mikroskobu ile tespit edilen intratübüler eozinofilik yapılar ve büyük vakuoller, yaygın germ hücrelerinin ölümünden sonra kalan hücresel kalıntıları ve boşlukları temsil eder. Bu bulgular, sıçanlarda busulfan maruziyeti sonrasında üreme fonksiyonunun etkilendiğini ve seminifer tübüllerde azalan ortalama seminifer tübül/lümen çapı, epitelyal kalınlık ve Johnson skoru gibi histomorfometrik değişiklikleri kanıtlamıştır.

Mevcut çalışmamızın sonuçları, aktif iWJ-MKH'lerden türetilen eksozomların intratestiküler enjeksiyonu sonrasında ortalama germ hücresi sayısı, Sertoli, Leydig, myoid hücreleri ve spermatogenez kriterlerinin düzeldiğini göstermiştir. Ayrıca, germinal epitelyumun dizilimi ve seminifer tübüllerin organizasyonu dikkate değer şekilde iyileştirildi. Tübüllerin etrafını saran bazal membranın da onarıldığı gözlendi. MKH'lerin

Sertoli hücresinin fonksiyonlarını taklit ettiği ve spermatogenezde anahtar rol oynayan GDNF, FGF2 ve diğer parakrin sitokinlerin salgılanması yoluyla spermatogonia havuzlarını koruyabildiği ileri sürülmektedir. Ek olarak, busulfan sonucu azalan ortalama seminifer tübül/lümen çapı, epitelyal kalınlık ve Johnson skoru gibi histomorfometrik değişikliklerde istatistiksel olarak anlamlı artış gözlendi. Aktif olmayan iWJ-MKH eksozomları da kısmen busulfan-indüklü testiküler toksisiteyi hafifletti. Çalışmamız, aktif ve aktif olmayan iWJ-MKH eksozomlarının testiküler hasar üzerindeki etkileri karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak aktif MKH eksozomlarının daha anlamlı olduğu kanıtlamıştır.

Busulfan oksidatif strese ve reaktif oksijen türlerinin (ROS) oluşumuna neden olur. ROS, mitokondriyal membranın bozulmasına neden olarak kaspaz-3 ekspresyonunun aktivasyonuna yol açarak apoptozu gösterir (Liakath Ali ve ark., 2024). Ayrıca MDA ve MPO ekspresyonunun artması ve GSH ekspresyonunun azalması apoptoza yol açmaktadır. Mevcut çalışma, testis dokusunda MDA seviyelerini ve MPO aktivitesini arttırdığını ve artan kaspaz-3 ekspresyonuna bağlı olarak GSH'nin antioksidan testiküler seviyelerini azalttığını kaydetti; bu durum, busulfan'ın neden olduğu testis hasarı, ROS oluşumunu ve inflamatuar yanıtları (IL-1β, TNF-α ve IFN-γ) içeren patofizyolojik basamakları desteklemektedir. Bu bulgu daha önce yapılan çalışmalarda da gözlemlenmiştir (Yue ve ark., 2024). Mevcut deney, in vivo iWJ-MKH eksozom tedavisiyle ROS seviyesini ve inflamatuar yanıtı bariz bir şekilde azaldığını gösterdi. iWJ-MKH eksozomlarının, hücrelerdeki DNA, lipitler ve proteinlere zarar verebilecek ROS ve pro-inflamatuar sitokin seviyelerini azaltarak, spermatogonia hasarının önlenmesine yardımcı olarak doku rejenerasyonunda daha iyi sonuçlara yol açabilir. Sonuçlarımız, Deng ve ark.'larının yaptığı idrardan türetilen MKH-eksozomlarının, busulfan kaynaklı NOA farelerinde endojen spermatogenez restorasyonunu kolaylaştırabildiği çalışma ile tutarlıdır (Deng ve ark., 2019). iWJ-MKH'lerinin önceden aktivasyonunun, anti-oksidatif ve immün-düzenleyici özelliğini arttırdığı için nötrofil extrasülerler tuzaklarını azaltarak ROS üretimini önemli oranda baskıladığı düşünülmektedir.

Spermatogenez, spermatogoniyal kök hücreler (SKH) adı verilen bir hücre popülasyonuna bağlıdır (Cai ve ark., 2021). In vivo azospermi modelinde, 40 mg/kg'lık bir dozda, busulfan ile germ hücrelerinin tükenmesini sağlamak ancak SKH'in kısmen hayatta kalmasına izin vermek yaygındır; kendiliğinden iyileşme 12 haftaya kadar kademeli olarak gerçekleşir (Zohni ve ark., 2012). Çalışmamızda, busulfan uygulamasından 8 hafta sonra beklenen yanıtlar gözlendi. MKH eksozomlarının, spermatogonia'nın daha hızlı

restorasyonunu sağlamak için kalan SKH'i aktive etmesini hipotez ettik. Mayoz bölünme, spermatogenezin önemli bir hücresel olayıdır ve mayozla ilişkili geniş genlerin adım adım düzenlenmesini içerir (Yuan ve ark., 2018). CyclinA1 ve Dazl gibi spesifik genler, ilk mayoz bölünmeyi başlatmak için spermatogonia ve primer spermatositlerde dağıtılır (Reijo ve ark., 2000). Yapılan bir çalışmada, mayoz profazını uyarmak için mayoz öncesi mitozlu hücrelerde yüksek Stra8 ekspresyonları tespit edilmiştir (Anderson ve ark., 2008). Vasa, Miwi, Pgk2 ve Scp3 mayoz metafazında spermatositlere dağılır (Mobarak ve ark., 2021). Çalışmamız, 8 haftalık busulfan maruziyeti sonrası spermatogoniyal tübüllerde önemli ölçüde vakuolasyona neden olarak spermatogonyal hücrelerde Piwil, Ddx4 ve Dazl proteinlerin ekspresyonları inhibe edilmesi ile birlikte mayotik sürecin baskılandığını göstermiştir. Mayozla ilişkili genlerin artan ekspresyonunu içeren mayotik öncesi ve mayotik sürecin yeniden aktivasyonu, azospermik hayvanlara eksozom uygulamasından sonra spermatogenik sürecin erken iyileşmesini göstermiştir. Bu bulgular, iWJ-MKH eksozomlarının spermatogenezin normal gelişiminde rol oynayabileceğini ileri sürebilir. Çalışmamızda Piwil, Ddx4 ve Dazl proteinlerinin germ hücresine spesifik ekspresyonu, aktif iWJ-MKH eksozom enjekte edilen testis grubunda aktif olmayan gruba göre anlamlı derecede daha yüksekti.

Kan-testis bariyeri esas olarak destekleyici hücreler arasındaki sıkı bağlantılardan oluşur. Çalışmamızda busulfan ile eksozom grupları arasındaki farklı ekspresyonu tespit etmek için sıkı bağlantıyla ilişkili protein ekspresyon moleküllerini seçtik. Bu sıkı bağlantılar, spermatogoniaya besin sağlamada, sitotoksik maddelerin germinal damar sistemine girmesini önlemede ve germinal damar sistemi içindeki germinal mikro ortamın stabilitesini korumada çok önemli bir rol oynar. Ancak busulfan bu bariyeri aşarak DNA'nın yapısını bozarak DNA replikasyonunu etkileyebilir. Busulfanın kan-testis bariyerine nüfuz etme ve DNA replikasyonunu etkileme yeteneği, testis spermatogenezini bozabilir (Zhao ve ark., 2020). Çalışmamızda, busulfanın yüksek saflığı ve geniş güvenlik aralığı, intraperitoneal enjeksiyon yoluyla testiküler spermatogenezin oluşturulmasına olanak sağlamıştır. Aynı zamanda, busulfan tarafından indüklenen oksidatif streshücre zarlarının peroksidasyonuna ve yırtılmasına, enerjiye bağımlı Na^{+}-K^{+} iyon pompalarının bozulmasına ve hücrelerin vakuolizasyonuna neden olarak Sertoli arası bağlantıların daha fazla bozulmasına neden olduğunu düşünmekteyiz. Sonuçlarımız, aktif iWJ-MKH eksozomlarının parakrin faktörlerinin serbest radikallerin baskılanması ve hücresel adezyon için çok önemli olan ZO-1 ve okludin protein komplekslerinin ekspresyonunun indüklenmesi yoluyla hücreler arası

bağlantı bütünlüğünü destekleme yeteneğine sahip olduğunu gösterdi. Sonuç olarak, aktif MKH eksozomları ile tedavi edilen grupta Sertoli hücrelerinin bazal membran üzerinde normal organizasyonu ile germinal hücrelerin dizilimi görünüşte sağlam görünüyordu. Aktif olmayan MKH eksozomlarının protein ekpresyon seviyeleri busulfan grubuna göre daha yüksekti; fakat aktif MKH eksozomlarının bağlantı proteinleri üzerindeki etkileri aktif olmayan eksozomlara göre istatistiksel olarak daha anlamlı bulundu.

Şu anda aktif iWJ-MKH eksozomların bileşimine ilişkin sınırlı bir netlik mevcuttur. Bu eksozomların proteinleri, küçük moleküler nükleik asitleri, lipit moleküllerini ve diğer bileşenleri kapsadığı bildirilmiş olmasına rağmen proteomik, transkriptomik, lipomik ve ilgili disiplinlerdeki spesifik bulgular hala belirsizliğini koruyor. Yaklaşan çabalar, eksozom bazlı tedavilerin altında yatan kesin mekanizmaları anlamak ve bunları erkek infertilitesi tedavisinde geleneksel kök hücre preparatlarından ayırmak için bu araştırmaların yürütülmesini içerecektir. Sonuç olarak, aktif iWJ-MKH eksozomların ayrıntılı bileşimini aydınlatmak ve bu bağlamda bireysel küçük moleküllerin oynadığı tam terapötik rolü belirlemek için kapsamlı omik çalışmalar yapmak zorunludur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Özetle, sonuçlarımız sıçanlarda busulfanın neden olduğu azospermide aktif MKH salgısının spermatogonyal yapıların restorasyonunu önemli ölçüde iyileştirebileceğini ve tübül yapılarının onarımının başarılabileceğini ancak spermatogenezin tam iyileşmesini gözlemlemek için daha fazla tedavi süresine ihtiyaç olduğunu gösterdi. Çalışmamız azospermide aktif ve aktif olmayan MKH sekresyonunun terapötik etkinliğinin karşılaştırılması açısından faydalıdır. Gelecekteki çalışmalar, azospermiye uygun yenilikçi farmakolojik ajanlar geliştirmek amacıyla potansiyel klinik kullanıma (örneğin aktif eksozom kalitesinin, dozajının, zamanlamasının ve dağıtım stratejisinin optimize edilmesi) ve etki mekanizmalarının daha fazla aydınlatılmasına odaklanmalıdır.

7. KAYNAKLAR

Abd El-Hay, R. I., Hamed, W. H. E., Mostafa Omar, N., Refat El-Bassouny, D., & Gawish, S. A. (2023). The impact of busulfan on the testicular structure in prepubertal rats: A histological, ultrastructural and immunohistochemical study. Ultrastructural pathology, 47(5), 424–450. https://doi.org/10.1080/01913123.2023.2234470.

Almeria, C., Weiss, R., Roy, M., Tripisciano, C., Kasper, C., Weber, V., & Egger, D. (2019). Hypoxia Conditioned Mesenchymal Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles Induce Increased Vascular Tube Formation in vitro. Frontiers in bioengineering and biotechnology, 7, 292. https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00292.

Alzahrani F. A. (2019). Melatonin improves therapeutic potential of mesenchymal stem cells-derived exosomes against renal ischemia-reperfusion injury in rats. American journal of translational research, 11(5), 2887–2907.

Anderson, E. L., Baltus, A. E., Roepers-Gajadien, H. L., Hassold, T. J., Rooij, D. G. d., Pelt, A. M. M. v., & Page, D. C. (2008). Stra8 and its inducer, retinoic acid, regulate meiotic initiation in both spermatogenesis and oogenesis in mice. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(39), 14976-14980. https://doi.org/10.1073/pnas.0807297105.

Bakhtyar, N., Jeschke, M. G., Mainville, L., Herer, E., & Amini-Nik, S. (2017). Acellular Gelatinous Material of Human Umbilical Cord Enhances Wound Healing: A Candidate Remedy for Deficient Wound Healing. Frontiers in physiology, 8, 200. https://doi.org/10.3389/fphys.2017.00200.

Banks W. A. (2019). The blood-brain barrier as an endocrine tissue. Nature reviews. Endocrinology, 15(8), 444–455. https://doi.org/10.1038/s41574-019-0213-7.

Bjørge, I. M., Kim, S. Y., Mano, J. F., Kalionis, B., & Chrzanowski, W. (2017). Extracellular vesicles, exosomes and shedding vesicles in regenerative medicine - a new paradigm for tissue repair. Biomaterials science, 6(1), 60–78. https://doi.org/10.1039/c7bm00479f.

Cai, Y. T., Xiong, C. L., Liu, T. S., Shen, S. L., Rao, J. P., & Qiu, F. (2021). Secretions released from mesenchymal stem cells improve spermatogenesis restoration of cytotoxic treatment with busulfan in azoospermia mice. Andrologia, 53(8), e14144. https://doi.org/10.1111/and.14144.

Cao, C., Zhang, H., He, Z., Zhang, K., Qian, Z., Shen, J., Zheng, L., Xue, M., Sun, S., Li, C., Zhao, W., Jing, J., Ma, R., Ge, X., & Yao, B. (2024). Octanoic acid mitigates busulfan-induced blood-testis barrier damage by alleviating oxidative stress and autophagy. Lipids in health and disease, 23(1), 180. https://doi.org/10.1186/s12944-024-02157-2.

Castro-Manrreza, M. E., Bonifaz, L., Castro-Escamilla, O., Monroy-García, A., Cortés-Morales, A., Hernández-Estévez, E., Hernández-Cristino, J., Mayani, H., & Montesinos, J. J. (2019). Mesenchymal Stromal Cells from the Epidermis and Dermis of Psoriasis Patients: Morphology, Immunophenotype, Differentiation Patterns, and Regulation of T Cell Proliferation. Stem cells international, 2019, 4541797. https://doi.org/10.1155/2019/4541797.

Chen, G., Wu, D., Guo, W., Cao, Y., Huang, D., Wang, H., Wang, T., Zhang, X., Chen, H., Yu, H., Zhang, X., Zhang, M., Wu, S., Song, J., Chen, T., Han, M., Li, S., Luo, X., Zhao, J., & Ning, Q. (2020). Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019. The Journal of clinical investigation, 130(5), 2620–2629. https://doi.org/10.1172/JCI137244.

Chen, X., Liang, M., & Wang, D. (2018). Progress on the study of the mechanism of busulfan cytotoxicity. Cytotechnology, 70(2), 497–502. https://doi.org/10.1007/s10616-018-0189-5.

Choi, Y. J., Ok, D. W., Kwon, D. N., Chung, J. I., Kim, H. C., Yeo, S. M., Kim, T., Seo, H. G., & Kim, J. H. (2004). Murine male germ cell apoptosis induced by busulfan treatment correlates with loss of c-kit-expression

in a Fas/FasL- and p53-independent manner. FEBS letters, 575(1-3), 41–51. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.08.034.

Dal Collo, G., Adamo, A., Gatti, A., Tamellini, E., Bazzoni, R., Takam Kamga, P., Tecchio, C., Quaglia, F. M., & Krampera, M. (2020). Functional dosing of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles for the prevention of acute graft-versus-host-disease. Stem cells (Dayton, Ohio), 38(5), 698–711. https://doi.org/10.1002/stem.3160.

Datta, A., Kim, H., McGee, L. et al. High-throughput screening identified selective inhibitors of exosome biogenesis and secretion: A drug repurposing strategy for advanced cancer. Sci Rep 8, 8161 (2018). https://doi.org/10.1038/s41598-018-26411-7.

Del Piccolo, N., Placone, J., He, L., Agudelo, S. C., & Hristova, K. (2012). Production of plasma membrane vesicles with chloride salts and their utility as a cell membrane mimetic for biophysical characterization of membrane protein interactions. Analytical chemistry, 84(20), 8650–8655. https://doi.org/10.1021/ac301776j.

Deng, L., Du, C., Song, P., Chen, T., Rui, S., Armstrong, D. G., & Deng, W. (2021). The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Diabetic Wound Healing. Oxidative medicine and cellular longevity, 2021, 8852759. https://doi.org/10.1155/2021/8852759.

Dilsiz N. (2020). Role of exosomes and exosomal microRNAs in cancer. Future science OA, 6(4), FSO465. https://doi.org/10.2144/fsoa-2019-0116.

Ding, J., Wang, X., Chen, B., Zhang, J., & Xu, J. (2019). Exosomes Derived from Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Stimulated by Deferoxamine Accelerate Cutaneous Wound Healing by Promoting Angiogenesis. BioMed research international, 2019, 9742765. https://doi.org/10.1155/2019/9742765.

Drobiova, H., Sindhu, S., Ahmad, R., Haddad, D., Al-Mulla, F., & Al Madhoun, A. (2023). Wharton's jelly mesenchymal stem cells: a concise review of their secretome and prospective clinical applications. Frontiers in cell and developmental biology, 11, 1211217. https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1211217.

Drobiova, H., Sindhu, S., Ahmad, R., Haddad, D., Al-Mulla, F., & Al Madhoun, A. (2023). Wharton's jelly mesenchymal stem cells: a concise review of their secretome and prospective clinical applications. Frontiers in cell and developmental biology, 11, 1211217. https://doi.org/10.3389/fcell.2023.1211217.

Furukawa, S., Usuda, K., Abe, M., Hayashi, S., & Ogawa, I. (2007). Busulfan-induced apoptosis in rat placenta. Experimental and toxicologic pathology : official journal of the Gesellschaft fur Toxikologische Pathologie, 59(2), 97–103. https://doi.org/10.1016/j.etp.2007.05.004.

Gimona, M., Pachler, K., Laner-Plamberger, S., Schallmoser, K., & Rohde, E. (2017). Manufacturing of Human Extracellular Vesicle-Based Therapeutics for Clinical Use. International journal of molecular sciences, 18(6), 1190. https://doi.org/10.3390/ijms18061190.

Gomzikova, M.O., Rizvanov, A.A. Current Trends in Regenerative Medicine: From Cell to Cell-Free Therapy. BioNanoSci. 7, 240–245 (2017). https://doi.org/10.1007/s12668-016-0348-0.

Gonzalez-King, H., García, N. A., Ontoria-Oviedo, I., Ciria, M., Montero, J. A., & Sepúlveda, P. (2017). Hypoxia Inducible Factor-1α Potentiates Jagged 1-Mediated Angiogenesis by Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes. Stem cells (Dayton, Ohio), 35(7), 1747–1759. https://doi.org/10.1002/stem.2618.

Hade, M. D., Suire, C. N., & Suo, Z. (2021). Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Applications in Regenerative Medicine. Cells, 10(8), 1959. https://doi.org/10.3390/cells10081959.

Han, Y. D., Bai, Y., Yan, X. L., Ren, J., Zeng, Q., Li, X. D., Pei, X. T., & Han, Y. (2018). Co-transplantation of exosomes derived from hypoxia-preconditioned adipose mesenchymal stem cells promotes neovascularization and graft survival in fat grafting. Biochemical and biophysical research communications, 497(1), 305–312. https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.02.076.

Han, Y., Ren, J., Bai, Y., Pei, X., & Han, Y. (2019). Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R. The international journal of biochemistry & cell biology, 109, 59–68. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.01.017.

Han, Y., Ren, J., Bai, Y., Pei, X., & Han, Y. (2019). Exosomes from hypoxia-treated human adipose-derived mesenchymal stem cells enhance angiogenesis through VEGF/VEGF-R. The international journal of biochemistry & cell biology, 109, 59–68. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.01.017.

Hanson, P. I., & Cashikar, A. (2012). Multivesicular body morphogenesis. Annual review of cell and developmental biology, 28, 337–362. https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-092910-154152.

Harting, M. T., Srivastava, A. K., Zhaorigetu, S., Bair, H., Prabhakara, K. S., Toledano Furman, N. E., Vykoukal, J. V., Ruppert, K. A., Cox, C. S., Jr, & Olson, S. D. (2018). Inflammation-Stimulated Mesenchymal Stromal Cell-Derived Extracellular Vesicles Attenuate Inflammation. Stem cells (Dayton, Ohio), 36(1), 79–90. https://doi.org/10.1002/stem.2730.

He, J. G., Li, H. R., Han, J. X., Li, B. B., Yan, D., Li, H. Y., Wang, P., & Luo, Y. (2018). GATA-4-expressing mouse bone marrow mesenchymal stem cells improve cardiac function after myocardial infarction via secreted exosomes. Scientific reports, 8(1), 9047. https://doi.org/10.1038/s41598-018-27435-9.

Ibrahim, H.F., Safwat, S.H., Zeitoun, T.M. et al. The Therapeutic Potential of Amniotic Fluid-Derived Stem Cells on Busulfan-Induced Azoospermia in Adult Rats. Tissue Eng Regen Med 18, 279–295 (2021). https://doi.org/10.1007/s13770-020-00309-w.

Jahanbani, Y., Beiranvand, T., Mamaghani, P. Y., Aghebati-Maleki, L., & Yousefi, M. (2023). Exosome- based technologies as a platform for diagnosis and treatment of male and female infertility-related diseases. Journal of reproductive immunology, 156, 103833. https://doi.org/10.1016/j.jri.2023.103833.

Jalnapurkar, S., Moirangthem, R. D., Singh, S., Limaye, L., & Kale, V. (2019). Microvesicles Secreted by Nitric Oxide-Primed Mesenchymal Stromal Cells Boost the Engraftment Potential of Hematopoietic Stem Cells. Stem cells (Dayton, Ohio), 37(1), 128–138. https://doi.org/10.1002/stem.2912.

Jin, P., Zhao, Y., Liu, H., Chen, J., Ren, J., Jin, J., Bedognetti, D., Liu, S., Wang, E., Marincola, F., & Stroncek, D. (2016). Interferon-γ and Tumor Necrosis Factor-α Polarize Bone Marrow Stromal Cells Uniformly to a Th1 Phenotype. Scientific reports, 6, 26345. https://doi.org/10.1038/srep26345.

Johnstone, R. M., Adam, M., Hammond, J. R., Orr, L., & Turbide, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). The Journal of biological chemistry, 262(19), 9412–9420.

Joo, H. S., Suh, J. H., Lee, H. J., Bang, E. S., & Lee, J. M. (2020). Current Knowledge and Future Perspectives on Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes as a New Therapeutic Agent. International journal of molecular sciences, 21(3), 727. https://doi.org/10.3390/ijms21030727.

Keshtkar, S., Azarpira, N. & Ghahremani, M.H. Mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles: novel frontiers in regenerative medicine. Stem Cell Res Ther 9, 63 (2018). https://doi.org/10.1186/s13287-018-0791-7.

Kierszenbaum A.L. ve Tres L.L. (2020) Histoloji ve Hücre Biyolojisi: Patolojiye Giriş. R. Demir (Çev), ANKARA: Palme Yayınevi.

Kim, Y. E., Sung, S. I., Chang, Y. S., Ahn, S. Y., Sung, D. K., & Park, W. S. (2019). Thrombin Preconditioning Enhances Therapeutic Efficacy of Human Wharton's Jelly-Derived Mesenchymal Stem Cells in Severe Neonatal Hypoxic Ischemic Encephalopathy. International journal of molecular sciences, 20(10), 2477. https://doi.org/10.3390/ijms20102477.

Laulagnier, K., Grand, D., Dujardin, A., Hamdi, S., Vincent-Schneider, H., Lankar, D., Salles, J. P., Bonnerot, C., Perret, B., & Record, M. (2004). PLD2 is enriched on exosomes and its activity is correlated to the release of exosomes. FEBS letters, 572(1-3), 11–14. https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.082.

Lee, S. C., Jeong, H. J., Lee, S. K., & Kim, S. J. (2015). Lipopolysaccharide preconditioning of adipose-derived stem cells improves liver-regenerating activity of the secretome. Stem cell research & therapy, 6(1), 75. https://doi.org/10.1186/s13287-015-0072-7.

Li, H., Yang, C., Shi, Y., & Zhao, L. (2018). Exosomes derived from siRNA against GRP78 modified bone-marrow-derived mesenchymal stem cells suppress Sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. Journal of nanobiotechnology, 16(1), 103. https://doi.org/10.1186/s12951-018-0429-z.

Li, H., Zuo, S., He, Z., Yang, Y., Pasha, Z., Wang, Y., & Xu, M. (2010). Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival. American journal of physiology. Heart and circulatory physiology, 299(6), H1772–H1781. https://doi.org/10.1152/ajpheart.00557.2010.

Liakath Ali, F., Park, H. S., Beckman, A., Eddy, A. C., Alkhrait, S., Ghasroldasht, M. M., Al-Hendy, A., & Raheem, O. (2023). Fertility Protection, A Novel Concept: Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes Protect against Chemotherapy-Induced Testicular Cytotoxicity. International journal of molecular sciences, 25(1), 60. https://doi.org/10.3390/ijms25010060.

Liang, Y. C., Wu, Y. P., Li, X. D., Chen, S. H., Ye, X. J., Xue, X. Y., & Xu, N. (2019). TNF-α-induced exosomal miR-146a mediates mesenchymal stem cell-dependent suppression of urethral stricture. Journal of cellular physiology, 234(12), 23243–23255. https://doi.org/10.1002/jcp.28891.

Liu, S. W., Li, H. T., Ge, R. S., & Cheng, C. Y. (2021). NC1-peptide derived from collagen α3 (IV) chain is a blood-tissue barrier regulator: lesson from the testis. Asian journal of andrology, 23(2), 123–128. https://doi.org/10.4103/aja.aja_44_20.

López-García, L., & Castro-Manrreza, M. E. (2021). TNF-α and IFN-γ Participate in Improving the Immunoregulatory Capacity of Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Importance of Cell-Cell Contact and Extracellular Vesicles. International journal of molecular sciences, 22(17), 9531. https://doi.org/10.3390/ijms22179531.

Lotfy, A., AboQuella, N. M., & Wang, H. (2023). Mesenchymal stromal/stem cell (MSC)-derived exosomes in clinical trials. Stem cell research & therapy, 14(1), 66. https://doi.org/10.1186/s13287-023-03287-7.

Lou, G., Song, X., Yang, F., Wu, S., Wang, J., Chen, Z., & Liu, Y. (2015). Exosomes derived from miR-122-modified adipose tissue-derived MSCs increase chemosensitivity of hepatocellular carcinoma. Journal of hematology & oncology, 8, 122. https://doi.org/10.1186/s13045-015-0220-7.

Lou, P., Liu, S., Xu, X., Pan, C., Lu, Y., & Liu, J. (2021). Extracellular vesicle-based therapeutics for the regeneration of chronic wounds: current knowledge and future perspectives. Acta biomaterialia, 119, 42–56. https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.11.001.

Lu, Z. Y., Chen, W. C., Li, Y. H., Li, L., Zhang, H., Pang, Y., Xiao, Z. F., Xiao, H. W., & Xiao, Y. (2016). TNF-α enhances vascular cell adhesion molecule-1 expression in human bone marrow mesenchymal stem cells via the NF-κB, ERK and JNK signaling pathways. Molecular medicine reports, 14(1), 643–648. https://doi.org/10.3892/mmr.2016.5314.

Lu, Z., Chen, Y., Dunstan, C., Roohani-Esfahani, S., & Zreiqat, H. (2017). Priming Adipose Stem Cells with Tumor Necrosis Factor-Alpha Preconditioning Potentiates Their Exosome Efficacy for Bone Regeneration. Tissue engineering. Part A, 23(21-22), 1212–1220. https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0548.

Ma, J., Zhao, Y., Sun, L., Sun, X., Zhao, X., Sun, X., Qian, H., Xu, W., & Zhu, W. (2017). Exosomes Derived from Akt-Modified Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Improve Cardiac Regeneration and Promote Angiogenesis via Activating Platelet-Derived Growth Factor D. Stem cells translational medicine, 6(1), 51–59. https://doi.org/10.5966/sctm.2016-0038.

Mao, B., Bu, T., Mruk, D., Li, C., Sun, F., & Cheng, C. Y. (2020). Modulating the Blood-Testis Barrier Towards Increasing Drug Delivery. Trends in pharmacological sciences, 41(10), 690–700. https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.07.002.

Mao, G., Zhang, Z., Hu, S., Zhang, Z., Chang, Z., Huang, Z., Liao, W., & Kang, Y. (2018). Exosomes derived from miR-92a-3p-overexpressing human mesenchymal stem cells enhance chondrogenesis and suppress cartilage degradation via targeting WNT5A. Stem cell research & therapy, 9(1), 247. https://doi.org/10.1186/s13287-018-1004-0.

Mendt, M., Kamerkar, S., Sugimoto, H., McAndrews, K. M., Wu, C. C., Gagea, M., Yang, S., Blanko, E. V. R., Peng, Q., Ma, X., Marszalek, J. R., Maitra, A., Yee, C., Rezvani, K., Shpall, E., LeBleu, V. S., & Kalluri, R. (2018). Generation and testing of clinical-grade exosomes for pancreatic cancer. JCI insight, 3(8), e99263. https://doi.org/10.1172/jci.insight.99263.

Mendt, M., Rezvani, K., & Shpall, E. (2019). Mesenchymal stem cell-derived exosomes for clinical use. Bone marrow transplantation, 54(Suppl 2), 789–792. https://doi.org/10.1038/s41409-019-0616-z.

Min, L., Zhu, S., Chen, L., Liu, X., Wei, R., Zhao, L., Yang, Y., Zhang, Z., Kong, G., Li, P., & Zhang, S. (2019). Evaluation of circulating small extracellular vesicles derived miRNAs as biomarkers of early colon cancer: a comparison with plasma total miRNAs. Journal of extracellular vesicles, 8(1), 1643670. https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1643670.

Mirhoseini, M., Saki, G., Hemadi, M., Khodadadi, A., & Mohammadi Asl, J. (2014). Melatonin and testicular damage in busulfan treated mice. Iranian Red Crescent medical journal, 16(2), e14463. https://doi.org/10.5812/ircmj.14463.

Mitrousis, N., Fokina, A. & Shoichet, M.S. Biomaterials for cell transplantation. Nat Rev Mater 3, 441–456 (2018). https://doi.org/10.1038/s41578-018-0057-0.

Mobarak, H., Heidarpour, M., Rahbarghazi, R., Nouri, M., & Mahdipour, M. (2021). Amniotic fluid-derived exosomes improved spermatogenesis in a rat model of azoospermia. Life sciences, 274, 119336. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2021.119336.

Nogueira-Pedro, A., Makiyama, E. N., Segreto, H. R. C., & Fock, R. A. (2021). The Role of Low-Dose Radiation in Association with TNF-α on Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells. Stem cell reviews and reports, 17(3), 968–980. https://doi.org/10.1007/s12015-020-10084-9.

Noronha, N. C., Mizukami, A., Caliári-Oliveira, C., Cominal, J. G., Rocha, J. L. M., Covas, D. T., Swiech, K., & Malmegrim, K. C. R. (2019). Priming approaches to improve the efficacy of mesenchymal stromal cell-based therapies. Stem cell research & therapy, 10(1), 131. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1224-y.

Otsuji, M., Takahara, M., Naruse, T., Guan, D., Harada, M., Zhe, P., Takagi, M., & Ogino, T. (2005). Developmental abnormalities in rat embryos leading to tibial ray deficiencies induced by busulfan. Birth defects research. Part A, Clinical and molecular teratology, 73(6), 461–467. https://doi.org/10.1002/bdra.20115.

Pan, B. T., & Johnstone, R. M. (1983). Fate of the transferrin receptor during maturation of sheep reticulocytes in vitro: selective externalization of the receptor. Cell, 33(3), 967–978. https://doi.org/10.1016/0092-8674(83)90040-5.

Phan, J., Kumar, P., Hao, D., Gao, K., Farmer, D., & Wang, A. (2018). Engineering mesenchymal stem cells to improve their exosome efficacy and yield for cell-free therapy. Journal of extracellular vesicles, 7(1), 1522236. https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1522236.

Pick, H., Schmid, E. L., Tairi, A. P., Ilegems, E., Hovius, R., & Vogel, H. (2005). Investigating cellular signaling reactions in single attoliter vesicles. Journal of the American Chemical Society, 127(9), 2908–2912. https://doi.org/10.1021/ja044605x.

Puyo, S., Montaudon, D., & Pourquier, P. (2014). From old alkylating agents to new minor groove binders. Critical reviews in oncology/hematology, 89(1), 43–61. https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2013.07.006.

Qin, Y., Liu, L., He, Y., Wang, C., Liang, M., Chen, X., Hao, H., Qin, T., Zhao, X., & Wang, D. (2016). Testicular Busulfan Injection in Mice to Prepare Recipients for Spermatogonial Stem Cell Transplantation Is Safe and Non-Toxic. PloS one, 11(2), e0148388. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0148388.

Ramesh, M., Mojaverrostami, S., Khadivi, F., Rastegar, T., Abbasi, Y., & Bashiri, Z. (2023). Protective effects of human amniotic membrane derived mesenchymal stem cells (hAMSCs) secreted factors on mouse spermatogenesis and sperm chromatin condensation following unilateral testicular torsion. Annals of anatomy

=Anatomischer Anzeiger:official organ of the Anatomische Gesellschaft, 249, 152084. https://doi.org/10.1016/j.aanat.2023.152084.

Reijo, R. A., Dorfman, D. M., Slee, R., Renshaw, A. A., Loughlin, K. R., Cooke, H., & Page, D. C. (2000). DAZ family proteins exist throughout male germ cell development and transit from nucleus to cytoplasm at meiosis in humans and mice. Biology of Reproduction, 63(5), 1490-1496. https://doi.org/10.1095/biolreprod63.5.1490.

Rezabakhsh, A., Sokullu, E. & Rahbarghazi, R. Applications, challenges and prospects of mesenchymal stem cell exosomes in regenerative medicine. *Stem Cell Res Ther* **12**, 521 (2021). https://doi.org/10.1186/s13287-021-02596-z.

Rezaie, J., Ajezi, S., Avci, Ç. B., Karimipour, M., Geranmayeh, M. H., Nourazarian, A., Sokullu, E., Rezabakhsh, A., & Rahbarghazi, R. (2018). Exosomes and their Application in Biomedical Field: Difficulties and Advantages. Molecular neurobiology, 55(4), 3372–3393. https://doi.org/10.1007/s12035-017-0582-7.

Riazifar, M., Mohammadi, M. R., Pone, E. J., Yeri, A., Lässer, C., Segaliny, A. I., McIntyre, L. L., Shelke, G. V., Hutchins, E., Hamamoto, A., Calle, E. N., Crescitelli, R., Liao, W., Pham, V., Yin, Y., Jayaraman, J., Lakey, J. R. T., Walsh, C. M., Van Keuren-Jensen, K., Lotvall, J., Zhao, W. (2019). Stem Cell-Derived Exosomes as Nanotherapeutics for Autoimmune and Neurodegenerative Disorders. ACS nano, 13(6), 6670–6688. https://doi.org/10.1021/acsnano.9b01004.

Saldaña, L., Bensiamar, F., Vallés, G., Mancebo, F. J., García-Rey, E., & Vilaboa, N. (2019). Immunoregulatory potential of mesenchymal stem cells following activation by macrophage-derived soluble factors. Stem cell research & therapy, 10(1), 58. https://doi.org/10.1186/s13287-019-1156-6.

Sayegh, S., El Atat, O., Diallo, K., Rauwel, B., Degboé, Y., Cavaignac, E., Constantin, A., Cantagrel, A., Trak-Smayra, V., Alaaeddine, N., & Davignon, J. L. (2019). Rheumatoid Synovial Fluids Regulate the Immunomodulatory Potential of Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Through a TNF/NF-κB-Dependent Mechanism. Frontiers in immunology, 10, 1482. https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01482.

Setchell B. P. (2008). Blood-testis barrier, junctional and transport proteins and spermatogenesis. Advances in experimental medicine and biology, 636, 212–233. https://doi.org/10.1007/978-0-387-09597-4_12.

Silva-Carvalho, A. É., Rodrigues, L. P., Schiavinato, J. L., Alborghetti, M. R., Bettarello, G., Simões, B. P., Neves, F. A. R., Panepucci, R. A., de Carvalho, J. L., & Saldanha-Araujo, F. (2020). GVHD-derived plasma as a priming strategy of mesenchymal stem cells. Stem cell research & therapy, 11(1), 156. https://doi.org/10.1186/s13287-020-01659-x.

Song, Y., Dou, H., Li, X., Zhao, X., Li, Y., Liu, D., Ji, J., Liu, F., Ding, L., Ni, Y., & Hou, Y. (2017). Exosomal miR-146a Contributes to the Enhanced Therapeutic Efficacy of Interleukin-1β-Primed Mesenchymal Stem Cells Against Sepsis. Stem cells (Dayton, Ohio), 35(5), 1208–1221. https://doi.org/10.1002/stem.2564.

Stanton P. G. (2016). Regulation of the blood-testis barrier. Seminars in cell & developmental biology, 59, 166–173. https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2016.06.018.

Stremersch, S., Vandenbroucke, R. E., Van Wonterghem, E., Hendrix, A., De Smedt, S. C., & Raemdonck, K. (2016). Comparing exosome-like vesicles with liposomes for the functional cellular delivery of small RNAs. Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society, 232, 51–61. https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.04.005.

Subra, C., Grand, D., Laulagnier, K., Stella, A., Lambeau, G., Paillasse, M., De Medina, P., Monsarrat, B., Perret, B., Silvente-Poirot, S., Poirot, M., & Record, M. (2010). Exosomes account for vesicle-mediated transcellular transport of activatable phospholipases and prostaglandins. Journal of lipid research, 51(8), 2105–2120. https://doi.org/10.1194/jlr.M003657.

Sweeney, M. D., Zhao, Z., Montagne, A., Nelson, A. R., & Zlokovic, B. V. (2019). Blood-Brain Barrier: From Physiology to Disease and Back. Physiological reviews, 99(1), 21–78. https://doi.org/10.1152/physrev.00050.2017.

Tao, S. C., Yuan, T., Zhang, Y. L., Yin, W. J., Guo, S. C., & Zhang, C. Q. (2017). Exosomes derived from miR-140-5p-overexpressing human synovial mesenchymal stem cells enhance cartilage tissue regeneration and prevent osteoarthritis of the knee in a rat model. Theranostics, 7(1), 180–195. https://doi.org/10.7150/thno.17133.

Théry, C., Witwer, K. W., Aikawa, E., Alcaraz, M. J., Anderson, J. D., Andriantsitohaina, R., Antoniou, A., Arab, T., Archer, F., Atkin-Smith, G. K., Ayre, D. C., Bach, J. M., Bachurski, D., Baharvand, H., Balaj, L., Baldacchino, S., Bauer, N. N., Baxter, A. A., Bebawy, M., Beckham, C., Zuba-Surma, E. K. (2018). Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines. Journal of extracellular vesicles, 7(1), 1535750. https://doi.org/10.1080/20013078.2018.1535750.

Ti, D., Hao, H., Tong, C., Liu, J., Dong, L., Zheng, J., Zhao, Y., Liu, H., Fu, X., & Han, W. (2015). LPS-preconditioned mesenchymal stromal cells modify macrophage polarization for resolution of chronic inflammation via exosome-shuttled let-7b. Journal of translational medicine, 13, 308. https://doi.org/10.1186/s12967-015-0642-6.

Varkouhi, A. K., Jerkic, M., Ormesher, L., Gagnon, S., Goyal, S., Rabani, R., Masterson, C., Spring, C., Chen, P. Z., Gu, F. X., Dos Santos, C. C., Curley, G. F., & Laffey, J. G. (2019). Extracellular Vesicles from Interferon-γ-primed Human Umbilical Cord Mesenchymal Stromal Cells Reduce Escherichia coli-induced Acute Lung Injury in Rats. Anesthesiology, 130(5), 778–790. https://doi.org/10.1097/ALN.0000000000002655.

Wang, D., Huang, S., Yuan, X., Liang, J., Xu, R., Yao, G., Feng, X., & Sun, L. (2017). The regulation of the Treg/Th17 balance by mesenchymal stem cells in human systemic lupus erythematosus. Cellular & molecular immunology, 14(5), 423–431. https://doi.org/10.1038/cmi.2015.89.

Wang, Y., Zheng, F., Gao, G., Yan, S., Zhang, L., Wang, L., Cai, X., Wang, X., Xu, D., & Wang, J. (2019). MiR-548a-3p regulates inflammatory response via TLR4/NF-κB signaling pathway in rheumatoid arthritis. Journal of cellular biochemistry, 120(2), 1133–1140. https://doi.org/10.1002/jcb.26659.

Wanjari, U.R., Gopalakrishnan, A.V. Blood-testis barrier: a review on regulators in maintaining cell junction integrity between Sertoli cells. Cell Tissue Res 396, 157–175 (2024). https://doi.org/10.1007/s00441-024-03894-7.

Wu, H., Oliver, A. E., Ngassam, V. N., Yee, C. K., Parikh, A. N., & Yeh, Y. (2012). Preparation, characterization, and surface immobilization of native vesicles obtained by mechanical extrusion of mammalian cells. Integrative biology: quantitative biosciences from nano to macro, 4(6), 685–692. https://doi.org/10.1039/c2ib20022h.

Wu, X., Goodyear, S. M., Tobias, J. W., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2011). Spermatogonial stem cell self-renewal requires ETV5-mediated downstream activation of Brachyury in mice. Biology of reproduction, 85(6), 1114–1123. https://doi.org/10.1095/biolreprod.111.091793.

Xin, H., Li, Y., Liu, Z., Wang, X., Shang, X., Cui, Y., Zhang, Z. G., & Chopp, M. (2013). MiR-133b promotes neural plasticity and functional recovery after treatment of stroke with multipotent mesenchymal stromal cells in rats via transfer of exosome-enriched extracellular particles. Stem cells (Dayton, Ohio), 31(12), 2737–2746.. Yoshioka, H., Geyer, C. B., Hornecker, J. L., Patel, K. T., & McCarrey, J. R. (2007). In vivo analysis of developmentally and evolutionarily dynamic protein -DNA interactions regulating transcription of the Pgk2 gene during mammalian spermatogenesis. Molecular and Cellular Biology, 27(22), 7871-7885. https://doi.org/10.1128/MCB.00990-07.

Yu, J., Ostowari, A., Gonda, A., Mashayekhi, K., Dayyani, F., Hughes, C. C. W., & Senthil, M. (2023). Exosomes as a Source of Biomarkers for Gastrointestinal Cancers. Cancers, 15(4), 1263. https://doi.org/10.3390/cancers15041263.

Yu, L., Gui, S., Liu, Y., Qiu, X., Zhang, G., Zhang, X., Pan, J., Fan, J., Qi, S., & Qiu, B. (2019). Exosomes derived from microRNA-199a-overexpressing mesenchymal stem cells inhibit glioma progression by down-regulating AGAP2. Aging, 11(15), 5300–5318. https://doi.org/10.18632/aging.102092.

Yu, Y., Yoo, S. M., Park, H. H., Baek, S. Y., Kim, Y. J., Lee, S., Kim, Y. L., Seo, K. W., & Kang, K. S. (2019). Preconditioning with interleukin-1 beta and interferon-gamma enhances the efficacy of human umbilical cord

blood-derived mesenchymal stem cells-based therapy via enhancing prostaglandin E2 secretion and indoleamine 2,3-dioxygenase activity in dextran sulfate sodium-induced colitis. Journal of tissue engineering and regenerative medicine, 13(10), 1792–1804. https://doi.org/10.1002/term.2930.

Yuan, T. L., Huang, W. J., He, J., Zhang, D., & Tang, W. H. (2018). Stage-specific gene profiling of germinal cells helps delineate the mitosis/meiosis transition. Plant Physiology, 176(2), 1610–1626. https://doi.org/10.1104/pp.17.01483.

Yuan, Z., Kolluri, K. K., Gowers, K. H., & Janes, S. M. (2017). TRAIL delivery by MSC-derived extracellular vesicles is an effective anticancer therapy. Journal of extracellular vesicles, 6(1), 1265291. https://doi.org/10.1080/20013078.2017.1265291.

Yue, D., Wang, F., Han, Y., Xiong, C., & Yang, R. (2024). Exosomes derived from umbilical cord mesenchymal stem cells ameliorate male infertility caused by busulfan in vivo and in vitro. Ecotoxicology and environmental safety, 272, 116063. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2024.116063.

Zhang, H. C., Liu, X. B., Huang, S., Bi, X. Y., Wang, H. X., Xie, L. X., Wang, Y. Q., Cao, X. F., Lv, J., Xiao, F. J., Yang, Y., & Guo, Z. K. (2012). Microvesicles derived from human umbilical cord mesenchymal stem cells stimulated by hypoxia promote angiogenesis both in vitro and in vivo. Stem cells and development, 21(18), 3289–3297. https://doi.org/10.1089/scd.2012.0095.

Zhang, Q., Fu, L., Liang, Y., Guo, Z., Wang, L., Ma, C., & Wang, H. (2018). Exosomes originating from MSCs stimulated with TGF-β and IFN-γ promote Treg differentiation. Journal of cellular physiology, 233(9), 6832–6840. https://doi.org/10.1002/jcp.26436.

Zhu, L. P., Tian, T., Wang, J. Y., He, J. N., Chen, T., Pan, M., Xu, L., Zhang, H. X., Qiu, X. T., Li, C. C., Wang, K. K., Shen, H., Zhang, G. G., & Bai, Y. P. (2018). Hypoxia-elicited mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitates cardiac repair through miR-125b-mediated prevention of cell death in myocardial infarction. Theranostics, 8(22), 6163–6177. https://doi.org/10.7150/thno.28021.

Zhu, Y. G., Feng, X. M., Abbott, J., Fang, X. H., Hao, Q., Monsel, A., Qu, J. M., Matthay, M. A., & Lee, J. W. (2014). Human mesenchymal stem cell microvesicles for treatment of Escherichia coli endotoxin-induced acute lung injury in mice. Stem cells (Dayton, Ohio), 32(1), 116–125. https://doi.org/10.1002/stem.1504.

Zimmermann, J. A., & McDevitt, T. C. (2014). Pre-conditioning mesenchymal stromal cell spheroids for immunomodulatory paracrine factor secretion. Cytotherapy, 16(3), 331–345. https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.09.004.

Zohni, K., Zhang, X., Tan, S. L., Chan, P., & Nagano, M. C. (2012). The efficiency of male fertility restoration is dependent on the recovery kinetics of spermatogonial stem cells after cytotoxic treatment with busulfan in mice. Human reproduction (Oxford, England), 27(1), 44–53. https://doi.org/10.1093/humrep/der357.